



Universidade Nova de Lisboa

**Estrutura Genética de Populações de *Glossina palpalis gambiensis*
(Diptera: Glossinidae) na República da Guiné-Bissau**



Eliane Ochôa Arez de Carvalho

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PARASITOLOGIA
MÉDICA

OUTUBRO, 2011



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Estrutura Genética de Populações de *Glossina palpalis*
gambiensis (Diptera: Glossinidae) na República da Guiné-
Bissau**

Eliane Ochôa Arez de Carvalho

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica.

Orientador:

Prof. Doutor João Pinto (UEIPM/IHMT/UNL)

Co-Orientador:

Prof. Doutora Odete Afonso (UEIPM/IHMT/UNL)

OUTUBRO DE 2011

Ao Marcus;

Porque sem ti perderia metade de mim.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar aqui os meus mais sinceros agradecimentos:

Ao meu Orientador, Prof. Doutor João Pinto (Grupo de Entomologia Médica da UEIPM/CMDT/IHMT/UNL), por toda a disponibilidade e apoio prestados e com quem eu aprendi mais que genética.

À minha Co-orientadora, Prof. Doutora Maria Odete Afonso (Grupo de Entomologia Médica da UEIPM/UPMM/IHMT/UNL), por toda a energia e minúcia contagiantes.

Ao Doutor Nuno Rolão (UCT/IHMT/UNL, CDMT/IHMT/UNL), por todo o auxílio e disponibilidade prestados.

À Doutora Patrícia Salgueiro (Grupo de Entomologia Médica da UEIPM/IHMT/UNL, CDMT/IHMT/UNL), pelo apoio incondicional, ensinamentos e amizade.

A todos os Professores e Colegas do Grupo de Entomologia Médica da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica do IHMT/UNL, por todos os momentos descompressores e boa disposição com que lidavam no dia-a-dia. Tenho de deixar aqui um agradecimento especial ao Bruno Gomes e ao José Luís Vicente, por todo o apoio paciente, pelo companheirismo e pela extrema disponibilidade com que sempre se mostraram.

A todos os colaboradores da Unidade de Clínica Tropical do IHMT/UNL, pela disponibilidade e prontidão em ajudar.

Aos meus Amigos que, mesmo longe, se mantiveram por perto.

At last but not least, à minha Família pelo apoio incondicional, pelo companheirismo e pelo amor, mas acima de tudo, por serem *A Família*. Porque parte do que sou se deve a eles, não posso deixar de expressar um sentido agradecimento aos meus pais e aos meus tios, Diná e Zé.

RESUMO

Estrutura genética de *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) na República da Guiné-Bissau

Eliane Arez de Carvalho

Glossina palpalis gambiensis é o principal vector de Tripanossomose Humana Africana (THA) na África Ocidental e a mosca tsé-tsé mais comum na Guiné-Bissau. Apesar da sua ampla distribuição, nenhum caso de THA tem sido reportado no país desde finais dos anos 70 do século XX. Populações naturais do Grupo *palpalis* demonstraram diferentes níveis de variação intraespecífica que podem influenciar a sua capacidade vectorial. Portanto, o conhecimento exacto acerca da identidade das espécies e estrutura populacional é essencial para prever o possível restabelecimento e propagação da transmissão de THA na Guiné-Bissau.

A variação genética foi analisada em amostras de *Glossina palpalis gambiensis* de cinco regiões da Guiné-Bissau, com recurso a microsatélites. Três das regiões pertencem à parte continental e duas representam a parte insular do país. No total, 261 moscas tsé-tsé do sexo feminino foram genotipadas para 11 *loci* microsatélites.

Baixos níveis de diferenciação genética foram observados entre as populações de *G. p. gambiensis* da Guiné-Bissau ($F_{ST} = 0,006$, $P = 0,002$). Este resultado está de acordo com a análise de agrupamentos, que revelou a presença de um único *cluster* agrupando todas as amostras, independentemente da origem geográfica. De um modo geral, estes resultados sugerem uma baixa subestruturação populacional em *G. p. gambiensis* nesta região. Análises de equilíbrio mutação-deriva sugerem ainda a ocorrência de expansão populacional recente.

As evidências genéticas sugerem consideráveis níveis de fluxo genético entre as populações continentais e entre as populações insulares e continentais da Guiné-Bissau. No caso do restabelecimento de focos de transmissão de THA, a possibilidade de disseminação do protozoário *Trypanosoma*, através da dispersão activa das moscas tsé-tsé, deve ser tida em conta no planeamento de estratégias de controlo vectorial na Guiné-Bissau.

PALAVRAS-CHAVE: *Glossina*, Tripanossomose Humana Africana, microsatélites, diferenciação genética.

ABSTRACT

Genetic structure of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) in the Republic of Guinea Bissau

Eliane Arez de Carvalho

Glossina palpalis gambiensis is the most common tsetse fly in Guinea-Bissau and a major vector of Human African Trypanosomiasis in West Africa (HAT). Despite its widespread distribution, no vector-mediated HAT transmission has been reported in the country since the late 1970s. Wild populations of the *palpalis* group display different levels of intraspecific variation that may influence vectorial capacity. Therefore, accurate knowledge on species identity and population structure is essential to predict the possible reestablishment and spread of HAT transmission in Guinea-Bissau.

Genetic variation was analyzed in *Glossina palpalis gambiensis* samples from five regions of Guinea Bissau. Three of the regions are in the mainland and two represent the insular part of the country. A total of 261 female tsetse flies were genotyped for 11 microsatellite loci.

Low levels of genetic differentiation were observed among *G. p. gambiensis* populations from Guinea-Bissau ($F_{ST} = 0.006$, $P = 0.002$). This result is in agreement with model-based clustering analyses that revealed the presence of a single population cluster grouping all samples, regardless of geographic origin. These results suggest very little population substructure in *G. p. gambiensis* from this region. Mutation-drift equilibrium analysis suggests the occurrence of a recent population expansion.

Genetic evidence suggests considerable gene flow among *G. palpalis gambiensis* populations within mainland and between islands and mainland Guinea-Bissau. In the case of focal reestablishment of HAT transmission, the possibility of *Trypanosoma* dissemination through tsetse fly active dispersal should be taken into account when planning vector control actions in Guinea-Bissau.

KEYWORDS: *Glossina*, Human African Trypanosomiasis, microsatellites, genetic differentiation.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tripanossomoses Africanas	2
1.1.1. Tripanossomose Humana Africana	3
1.1.2. Tripanossomose Animal Africana.....	5
1.2. O insecto vector das tripanossomoses Africanas.....	6
1.2.1. Distribuição geográfica, dos Subgéneros ou Grupos, das glossinas	8
1.2.2. Ciclo de vida e aspectos bioecológicos das glossinas	10
1.2.3. Espécies e subespécies glossínicas com importância em medicina humana e veterinária	13
1.3. Controlo da tripanossomose Africana	14
1.3.1. Métodos de combate ao parasita	15
1.3.2. Métodos de combate ao vector.....	16
1.4. Tripanossomoses e seus vectores na Guiné-Bissau	18
1.5. Microssatélites	20
1.6. Estudos de genética populacional em insectos vectores.....	21
1.7. Estudos de genética de populações de <i>Glossina</i> spp.	22
1.7.1. <i>Glossina palpalis</i> sspp.....	22
1.7.2. Outras populações de <i>Glossina</i> sspp.	24
1.8. Objectivos do estudo	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1. Caracterização dos locais de captura das glossinas, identificação morfológica e conservação dos exemplares capturados	27
2.2. Preparação das glossinas para extracção de DNA.....	28
2.3. Extracção, quantificação e pureza do DNA genómico.....	29
2.4. Genotipagem de microssatélites	30
2.4.1. Microssatélites em PCR <i>multiplex</i>	32
2.4.2. Microssatélites em PCR simples.....	33

2.4.3. Qualidade de amplificação em PCR <i>multiplex</i> e PCR simples.....	34
2.4.4. Análise de fragmentos.....	34
2.5. Análise estatística dos dados genéticos	35
2.5.1. Diversidade genética	35
2.5.1.1. Frequências alélicas	35
2.5.1.2. Diversidade alélica e riqueza alélica.....	35
2.5.1.3. Heterozigotia esperada e observada.....	36
2.5.1.4. Princípio de Hardy-Weinberg	36
2.5.1.5. Endogamia	37
2.5.1.6. Desequilíbrio de <i>linkage</i>	38
2.5.2. Alelos nulos.....	38
2.5.3. Estrutura populacional	38
2.5.4. Isolamento por distância	40
2.5.5. Análise de <i>Bottleneck</i>	40
2.5.6. Nível de significância dos testes estatísticos.....	41
3. RESULTADOS.....	42
3.1. Quantificação e pureza do DNA genómico.....	43
3.2. Análise genética dos dados obtidos para os <i>loci</i> microsatélite	45
3.2.1. Diversidade genética	45
3.2.2. Alelos nulos.....	47
3.2.3. Estruturação populacional.....	48
3.2.4. Isolamento por distância	53
3.2.5. Análise de <i>Bottleneck</i>	53
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	55
4.1. Diversidade genética.....	56
4.2. Diferenciação genética e subestruturação populacional.....	57
4.3. Expansão populacional	59
4.4. Conclusões e implicações para o controlo.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ÍNDICE DE FIGURAS.....	77
ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS.....	79
ANEXOS.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorvância

AFC – Análise Factorial de Correspondência

DB289 – 2,5-Bis[4-(*N*-methoxyamidino)phenyl]furan Monomaleate (2,5-Bis[N-fenilmetoxiamidino]furano monomaleato)

ddH₂O – água bidestilada

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTPs – *deoxyribonucleotide Triphosphate* (3'-desoxinucleósido-5'-trifosfato)

DTNs – Doenças Tropicais Negligenciadas

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

EM – *Expectation Maximization* (Expectativa de Maximização)

EUA – Estados Unidos da América

FAM – 6-carboxyfluorescein (6-carboxifluoresceína)

FC – *Factorial Correspondence* (Correspondência factorial)

Fig. – Figura

H_e – heterozigotia esperada

HEX – *hexachlorofluorescein* (Hexaclorofluoresceína)

H_o – heterozigotia observada

IAM – *Infinite Allele Model* (modelo dos alelos infinitos)

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

ITS – *Internal Transcribed Spacer* (Espaçador transcrito interno)

K – *Cluster* (agrupamento populacional)

MDE – *Mutation-Drift Equilibrium* (Equilíbrio mutação-deriva)

mtDNA – DNA mitocondrial

N – tamanho amostral

N_e – tamanho efectivo populacional

NECT – *Nifurtimox/Eflornithine Combination Treatment* (Tratamento combinado de nifurtimox e eflornitina)

NED – *N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride* (N-1-diidrocloreto de naftiletilenodiamina)

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reacção de Polimerase em cadeia)

pp. – páginas

r – frequência de alelos nulos

RDC – República Democrática do Congo

rDNA – DNA ribossomal

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

rpm – rotações por minuto

SIT – *Sterile Insect Technique* (Técnica dos insectos estéreis)

SMM – *Stepwise Mutation Model* (Modelo de mutação passo-a-passo)

sp. – espécie

spp. – espécies

ssp. – subespécie

sspp. – subespécies

TAA – Tripanossomose Animal Africana

Tab. – Tabela

TBE – Tris/Borato/EDTA (solução tampão constituída por base Tris, ácido bórico e EDTA)

THA – Tripanossomose Humana Africana

TPM – *Two-Phased Model* (Modelo duas fases)

U – Unidade

UEM – Unidade de Entomologia Médica

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tripanossomoses Africanas

As tripanossomoses Africanas são parasitoses que podem afectar tanto o Homem como outros animais e cujos agentes etiológicos são protozoários do Género *Trypanosoma*. Estes parasitas desenvolvem-se e multiplicam-se, extracelularmente, no sangue dos hospedeiros vertebrados (reservatórios ou acidentais), sendo transmitidos pela picada dos vectores, insectos do Género *Glossina*, mais comumente conhecidos por moscas tsé-tsé ou moscas do sono. A distribuição das tripanossomoses em África verifica-se nas regiões onde existe o insecto vector e compreende uma área de cerca de 8 milhões de km² entre 14° de latitude Norte e 20° de latitude Sul (Steverding, 2008).

No início do século XX, esta doença dizimou populações em muitas regiões da África subsariana. Em 1901, Portugal foi o primeiro país a iniciar campanhas contra a doença do sono (Bettencourt & Benoliel, 1907). Nos anos 30, verificou-se uma enorme tomada de consciência do impacte negativo da doença, por parte dos administradores coloniais, e o consequente desenvolvimento e estabelecimento de programas de controlo (Simarro *et al.*, 2008). Em meados dos anos 60, a transmissão da doença foi praticamente debelada e acreditou-se que a sua eliminação seria possível (Simarro *et al.*, 2011). No entanto, com a independência da maioria dos países onde a tripanossomose era endémica, as autoridades nacionais depararam-se com outras prioridades. Assim, a raridade de casos e a não sensibilização para a possível reemergência da doença, levou a uma redução, ou mesmo interrupção, da vigilância, o que coincidiu com o reaparecimento de novos casos nas áreas endémicas, outrora controladas (Simarro *et al.*, 2008).

Apesar da preocupação da Organização Mundial de Saúde (OMS) relativamente ao aumento dos casos de tripanossomose, alterações sociais, guerras civis e um elevado fluxo migratório populacional, combinados com situações económicas precárias e uma escassa sensibilização das comunidades, levaram a uma contínua propagação da doença (Simarro *et al.*, 2008). As tripanossomoses Africanas são assim consideradas doenças negligenciadas, inserindo-se no grupo das dezassete Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). Embora clinicamente distintas, as DTNs estão intimamente associadas à pobreza, com elevada distribuição em áreas tropicais onde tendem a coexistir (WHO, 2010).

Apesar do número de casos actuais parecer insignificante a uma escala mundial, as características e os focos de distribuição das tripanossomoses Africanas podem ter um efeito socioeconómico relevante nas zonas afectadas (Brun *et al.*, 2010). Neste momento, os países da África subsariana mais afectados por estas parasitoses são Angola, República Democrática do Congo e Sudão, com mais de 1000 novos casos reportados por ano (Simarro *et al.*, 2010; WHO, 2010).

1.1.1. Tripanossomose Humana Africana

A Tripanossomose Humana Africana (THA) é causada por duas subespécies de parasita morfológicamente idênticas: *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense* (Guerrant *et al.*, 2005). O mapa de distribuição destes parasitas (Fig.1) revela uma separação entre as regiões onde ocorrem as subespécies, que segue a divisão geológica de África, o vale do *Rift*. Esta separação está fortemente relacionada com a epidemiologia da doença (Welburn *et al.*, 2001). Alguns trabalhos sugerem que o vale do *Rift* actua como uma barreira ao fluxo genético, como foi demonstrado para *Anopheles gambiae* (Kamau *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 1999) e *G. fuscipes fuscipes* (Abila *et al.*, 2008). No entanto, neste último estudo, demonstrou-se que a estruturação genética das populações de moscas tsé-tsé não está correlacionada com as subespécies de tripanossomas por elas transmitidas e que, provavelmente, a introdução destes parasitas em regiões onde estão ausentes poderá ser determinada pelo fluxo migratório do Homem e animais (Welburn *et al.*, 2001; Abila *et al.*, 2008)

A THA afecta essencialmente regiões rurais onde o acesso a cuidados de saúde é em regra escasso ou mesmo inexistente. Dos cerca de 36 países considerados endémicos para esta doença (Fig.1), 24 são endémicos para a forma *gambiense* e 13 para a forma *rhodesiense*, sendo o Uganda endémico para ambas as formas da doença (Simarro *et al.*, 2008; Cecchi *et al.*, 2009).

O parasita *T. b. gambiense*, geralmente responsável por uma infecção antroponótica (Fèvre *et al.*, 2008), infecta glossinas que habitam as galerias florestais da África Central e Ocidental. A transmissão ao Homem ocorre através da picada de glossinas, em áreas rurais e peridomésticas, que ocupam zonas habitadas, áreas de cultivo e cursos de água frequentados pelos seres humanos (Guerrant *et al.*, 2005). Esta subespécie de tripanossoma é responsável por mais de 90% dos casos reportados

(Simarro *et al.*, 2008; Cecchi *et al.*, 2009; Chappuis *et al.*, 2010; WHO, 2010), causando a forma crónica da doença e levando à morte dos indivíduos infectados no espaço de anos, se não forem tratados (Simarro *et al.*, 2008; Steverding, 2008). Apesar de ser possível isolar esta subespécie parasitária de hospedeiros animais, não significa que os mesmos sirvam de reservatório da infecção para os seres humanos (Fèvre *et al.*, 2008).

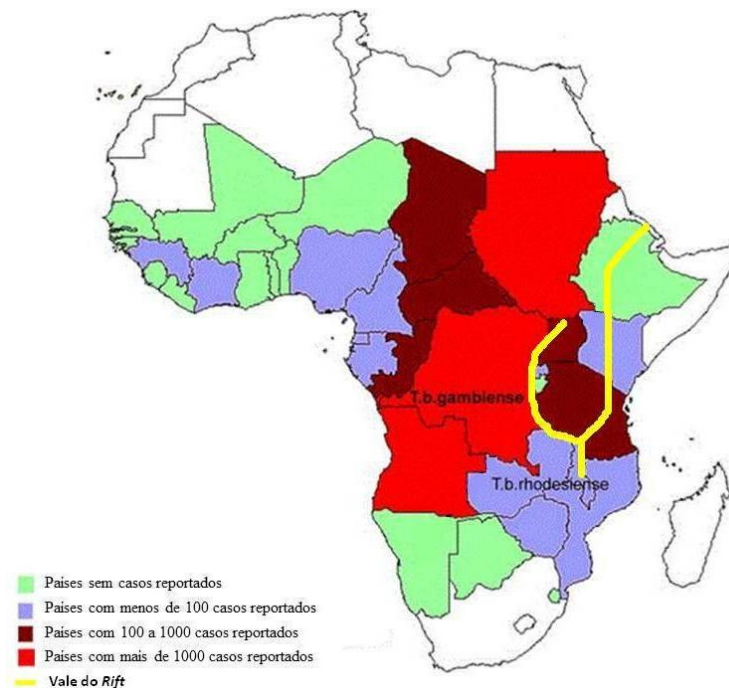


Figura 1. Distribuição da THA causada por *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* na África subsariana com a situação epidemiológica de cada país (adaptado de <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/9999/basics/epidemiology.html>, 5 de Março de 2011).

A forma aguda de THA, que é fatal em poucos meses se não tratada, é causada por *T. b. rhodesiense* (Guerrant *et al.*, 2005). Este parasita é responsável por menos de 10% dos casos reportados anualmente (Simarro *et al.*, 2008; Cecchi *et al.*, 2009; Chappuis *et al.*, 2010; WHO, 2010). As espécies glossínicas que transmitem este protozoário habitam predominantemente a savana da África Oriental e a infecção do Homem ocorre quando este se introduz no território do vector para realizar actividades silváticas (*e.g.* caçadores, lenhadores, turistas em reservas de caça). Esta forma de THA é considerada uma zoonose, com uma variedade de animais silváticos e domésticos conhecidos como reservatórios do referido tripanossoma (Fèvre *et al.*, 2008).

Os animais silváticos e domésticos desempenham um papel importante como reservatórios. No entanto, devido à ausência inicial de sintomas e à cronicidade da infecção causada pela subespécie *T. b. gambiense*, humanos infectados podem ser

também reservatórios durante vários anos, contribuindo para o ciclo de transmissão vectorial (Fèvre *et al.*, 2008).

Pensa-se que cerca de 60 milhões de pessoas estejam em risco de contrair THA (Courtin *et al.*, 2008; Chinnock, 2009), tendo sido reportados no ano de 2009 cerca de 10 mil novos casos (Simarro *et al.*, 2010). Contudo, a dificuldade de acesso a determinadas regiões endémicas mais remotas, aliada a situações de instabilidade social, podem resultar numa percentagem considerável de casos não reportados, o que afecta as estimativas do verdadeiro impacte desta doença, tal como acontece com a maioria das DTNs (Cecchi *et al.*, 2009). Assim, estima-se que a incidência mais provável varie entre 50 a 70 mil casos por ano (Fèvre *et al.*, 2008; Hotez & Kamath, 2009; Chappuis *et al.*, 2010).

As zonas fronteiriças de áreas endémicas favorecem o desenvolvimento da THA. Geralmente, são áreas com elevada prevalência devido à mobilidade humana, ao facto de estarem localizados, na maioria das vezes, longe da capital e, consequentemente, afastadas de hospitais ou serviços de saúde. Além disso, em casos de conflitos armados as pessoas tendem a refugiar-se em zonas de fronteira, promovendo a co-existência entre indivíduos infectados e indivíduos não infectados em áreas infestadas com moscas tsé-tsé e com condições de vida bastante precárias, facilitando o contacto Homem-vector (Courtin *et al.*, 2008; Cecchi *et al.*, 2009).

1.1.2. Tripanossomose Animal Africana

A Tripanossomose Animal Africana (TAA) afecta animais silváticos e domésticos e é causada por várias espécies de *Trypanosoma*, das quais se destacam *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma brucei brucei*. Enquanto nos animais silváticos a infecção é geralmente assintomática, nos animais domésticos a infecção é grave e frequentemente fatal (Afonso, 2000; Steverding, 2008).

A doença pode manifestar-se por febre, emagrecimento acentuado (Fig.2), alopecia, secreção ocular, edema, anemia, aborto e paralisia. Com a progressão da parasitose, o animal fica cada vez mais fraco tornando-se inapto para o trabalho, daí a origem do nome nagana (*N'gana* – palavra de origem Zulu que significa incapaz/inútil), designação dada vulgarmente a esta doença (Steverding, 2008).



Figura 2. Gado bovino com nagana (<http://www.iaea.org/OurWork/ST/NA/NAAL/agri/ent/pic/nagana.jpg>, 14 de Março de 2011).

Em alguns países da África Ocidental, como Burkina Faso, a TAA é o maior obstáculo ao desenvolvimento eficiente e sustentável dos sistemas de produção de gado, sendo também considerada uma das causas de fome e pobreza na maioria dos países subsarianos (Bouyer *et al.*, 2010).

1.2. O insecto vector das tripanossomoses Africanas

Os tripanossomas responsáveis pela THA e TAA têm como vectores as glossinas de ambos os sexos (Fig.3). Além das glossinas serem vectoras de diferentes espécies de tripanossomas, a importância médica destes dípteros deve-se também ao facto de serem agentes de incomodidade, uma vez que a picada é dolorosa e pode ser responsável por reacções alérgicas cutâneas de maior ou menor gravidade (Gooding & Krafur, 2005).

A posição sistemática do Género *Glossina* Wiedeman, 1830 é a seguinte: Filo Arthropoda, Classe Insecta, Subclasse Pterygota, Superordem Endopterygota, Ordem Diptera, Subordem Brachycera, Infraordem Muscomorpha, Superfamília Hippoboscoidea e Família Glossinidae.



Figura 3. *Glossina* sp. (<http://www.microbiologybytes.com/introduction/graphics/Tsetse.jpg>, 4 de Abril de 2011).

A Família Glossinidae apresenta apenas um único Género, *Glossina*. Dentro deste Género conhecem-se 31 espécies e subespécies divididas em três Grupos ou Subgéneros, de acordo com as suas características ecológicas e morfológicas.

Morfológicamente, as glossinas adultas são moscas alongadas (em repouso, as asas cruzam uma sobre a outra e sobre o abdómen), de aspecto robusto, de cor acastanhada (escura ou clara) e de comprimento entre 6 a 16 mm. As antenas apresentam o 3º segmento alongado e uma arista cuja fase dorsal apresenta sedas secundariamente ramificadas (Fig.4). Nas asas, a 4ª e 5ª nervuras delimitam uma célula, ou malha, em forma de machado (Fig.4), característica deste Género. Os machos e as fêmeas distinguem-se através das genitálias ou terminálias (Afonso, 2000).



Figura 4. Antena e asa características de *Glossina* sp. (adaptado de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Tsetse_aristaHairs_labeled.jpeg e de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/d/d3/20060718101155!Tsetse_foldedWings.jpg, 27 de Julho de 2011).

A identificação dos adultos, ou imagos, assenta em vários caracteres morfológicos que são utilizados em chaves dicotómicas, nomeadamente, a forma e a proporção da antena (comprimento/largura do 3º segmento antenar); a franja antenar; a cor da face inferior do bolbo do probóscis; as sedas pleurais e da esquama torácica; a coloração do tórax; o comprimento das sedas medianas do escutelo; a cor dos segmentos tarsais das patas posteriores; as bandas coradas da face dorsal do abdómen, ou variação cromática dos segmentos abdominais; a existência, ou não, de calosidades ou cicatrizes copuladoras (*mating scars*) na face ventral do 6º segmento abdominal das fêmeas do Grupo *palpalis*; as estruturas dos forcípulos superiores e inferiores dos machos e as placas genitais das fêmeas (Afonso, 2000).

1.2.1. Distribuição geográfica, dos Subgéneros ou Grupos, das glossinas

As glossinas são dípteros exclusivamente Africanos e subsarianos. O limite Norte da área de distribuição aproxima-se dos 15° latitude Norte e o limite meridional corresponde a cerca de 20° latitude Sul, inflectindo-se, na costa Oriental, até 30° latitude Sul (Fig.5). Os limites devem-se a factores abióticos: acentuado défice higrométrico e elevadas temperaturas a Norte (deserto do Sahara) e temperaturas muito baixas a Sul (deserto do Namibe), incompatíveis com o ciclo de vida destes insectos. São também de elevada relevância os factores bióticos, nomeadamente, o tipo de vegetação e os hospedeiros vertebrados fontes de alimentação (Leak, 1999; Afonso, 2000).

As maiores densidades populacionais ocorrem na África Ocidental e Central (Despommier *et al.*, 2005). Em geral são encontradas no interior ou na periferia de áreas arborizadas, uma vez que não podem sofrer exposição a temperaturas e taxas de evaporação muito elevadas (Gooding *et al.*, 2005). No entanto, a distribuição das moscas tsé-tsé é descontínua uma vez que cada espécie e/ou subespécie se encontra em habitats relativamente específicos (Despommier *et al.*, 2005; Gooding & Krafur, 2005).

Os três Grupos ou Subgéneros glossínicos são os seguintes: Grupo *palpalis* ou Subgénero *Nemorhina*, Grupo *morsitans* ou Subgénero *Glossina* e Grupo *fusca* ou Subgénero *Austenina* (ver espécies e subespécies em anexo – Quadro 1) (Despommier *et al.*, 2005).

As glossinas do Grupo *palpalis* distribuem-se por zonas de elevada humidade da África Ocidental e Central (Fig.5), habitando a floresta tropical húmida ou de folha persistente (floresta húmida climática e floresta edáfica) (Afonso, 2000). Ainda que se verifique a sua presença em zonas de transição de floresta para savana herbácea, estas glossinas estão em regra associadas à vegetação marginando rios, lagos, lagoas, pântanos e mangais, distribuindo-se ao longo dos cursos de água, nas chamadas galerias florestais. São consideradas espécies higrófilas, não por terem necessidade directa de água mas pelo que encontram perto desta (humidade; vegetação que lhes sirva de abrigo e locais de larviposição; espaço de voo e hospedeiros vertebrados). Encontram-se também em áreas junto a palmeiras, plantações de café, cacau, caju e na periferia das

aldeias em zonas florestais. Algumas espécies deste Grupo apresentam competência para zonas periurbanas (Buxton, 1955; Afonso, 2000).

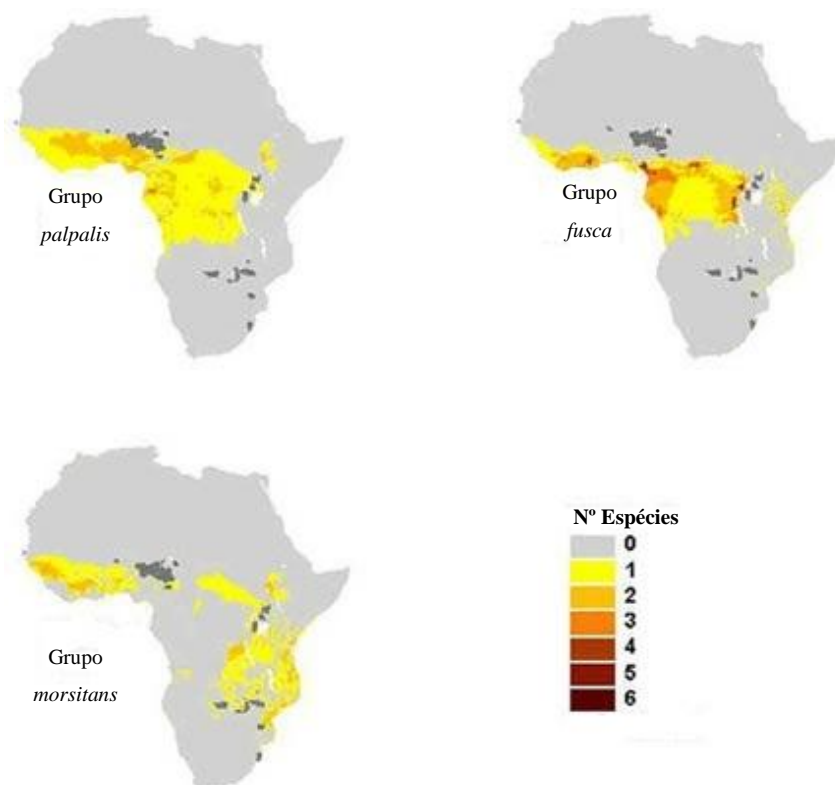


Figura 5. Distribuição dos diferentes Grupos de glossinas, com indicação do número de espécies e subespécies presentes em cada região para cada Grupo (adaptado de http://www.medicalecology.org/diseases/african_trypano/group%20distribution.jpg, 9 de Março de 2011).

As espécies do Grupo *morsitans*, também conhecidas por “glossinas de caça”, são consideradas glossinas xerófilas (habitats mais secos) e ocupam vastas áreas de savana e de floresta aberta, apresentando uma distribuição em superfície, contrariamente às do Grupo *palpalis*. A área de distribuição é predominantemente Oriental (Fig.5), com exceções como *G. morsitans submorsitans* e *G. longipalpis*. *Glossina morsitans submorsitans* estende-se por diversos tipos de savana herbácea da África Ocidental e Central e *G. longipalpis* encontra-se na floresta de transição entre a savana seca e a grande floresta da África Ocidental (Afonso, 2000). A distribuição das glossinas do Grupo *morsitans* está também intimamente relacionada com a distribuição de animais silváticos (Leak, 1999; Despommier *et al.*, 2005).

As glossinas do Grupo *fusca* estão associadas a zonas de floresta húmida e densa ou a margens florestais da África Ocidental (Fig.5), coincidindo em grande parte com a

área de distribuição de espécies do Grupo *palpalis* (Afonso, 2000). No entanto, espécies como *G. brevipalpis* e *G. longipennis* são encontradas em zonas secas da savana da África Oriental e Meridional (Despommier *et al.*, 2005).

As alterações climáticas e as actividades humanas influenciam, não só a ecologia das populações de glossinas, mas também o aparecimento e desaparecimento de focos de THA (Leak, 1999; Courtin *et al.*, 2008; Cecchi *et al.*, 2009).

1.2.2. Ciclo de vida e aspectos bioecológicos das glossinas

Ao contrário da maioria das espécies de insectos que produzem uma elevada quantidade de ovos por cada ciclo reprodutivo, as glossinas produzem apenas um ovo que embriona e eclode no aparelho reprodutor da fêmea, onde se desenvolve até ao 3º estágio larvar (LIII) (Gooding & Krafur, 2005). O mecanismo de viviparidade adenotrófica, existente nas glossinas, deve-se ao facto da fecundação do ovo e a alimentação e desenvolvimento larvares processarem-se no interior do útero (Fig.6).

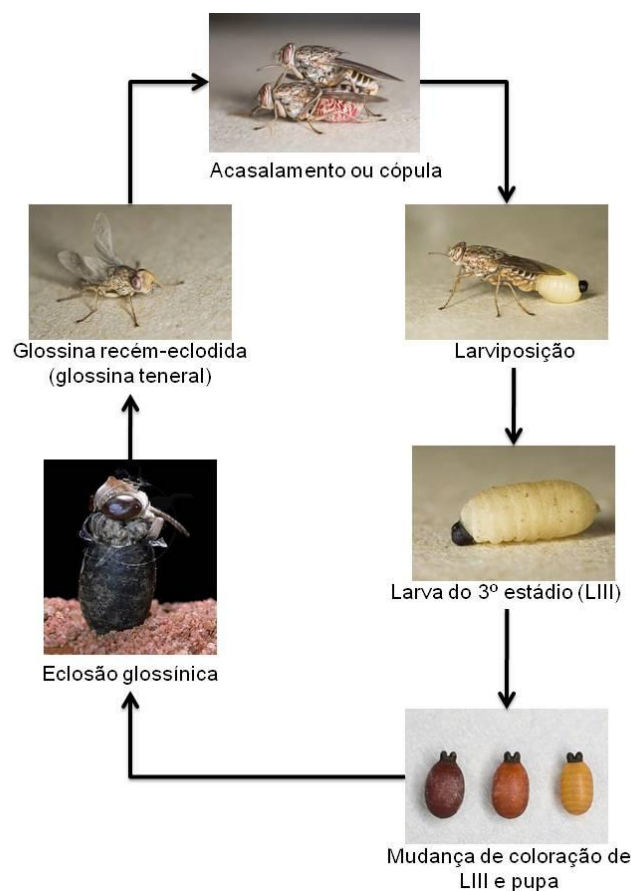


Figura 6. Ciclo de vida das glossinas (adaptado de http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/Tsetse_Fly.html e <http://www.warrenphotographic.co.uk/sets.php?page=3&q=&w=0406>, 4 de Abril de 2011).

Cerca de três dias após a fertilização do ovo dá-se início ao primeiro estágio larvar (LI), o qual passa por mais dois estádios no interior do útero, sendo a larva alimentada pelas secreções das glândulas uterinas (Gillot, 2005). A larviposição, ou “postura” da LIII é efectuada por volta do 14º dia, normalmente de dia e perto dos locais habituais de repouso dos adultos, em solos não compactos, por vezes arenosos, sob troncos e ramos caídos de árvores, mas sempre à sombra. A LIII penetra no solo a pouca profundidade, imobiliza-se e o tegumento escurece (Fig.6), até que por fim endurece e torna-se opaco dando origem ao pupário, mais correntemente designado por pupa. Este processo, desde a expulsão da larva à formação do pupário, dura apenas alguns minutos (Afonso, 2000). Dependendo da temperatura e humidade, as fêmeas produzem uma larva a cada 9-10 dias originando a primeira descendência quando atingem cerca de 16 dias de idade (Leak, 1999).

A eclosão da glossina adulta verifica-se vulgarmente a meio da tarde, sendo condicionada pelo fotoperíodo e principalmente pela temperatura. Portanto, o adulto teneral eclodirá após um período pupal que ronda os 30 dias a 27°C (Leak, 1999; Afonso, 2000). As fêmeas do Grupo *palpalis* já se mostram dispostas a copular e capazes de serem fecundadas um dia após a eclosão, mas só no 3º dia de vida atingem a capacidade máxima de acasalamento e fertilização. Devido à pressão dos aguçados forcíbulos superiores (Fig.7), que os machos utilizam para as segurar durante a cópula e que dura cerca de uma hora, nas fêmeas deste Grupo verificam-se, na face ventral do abdómen, duas calosidades simétricas (Fig.7), que se apresentam escuras, permanecendo após o primeiro acasalamento e que são designadas por cicatrizes copuladoras (Machado, 1958).

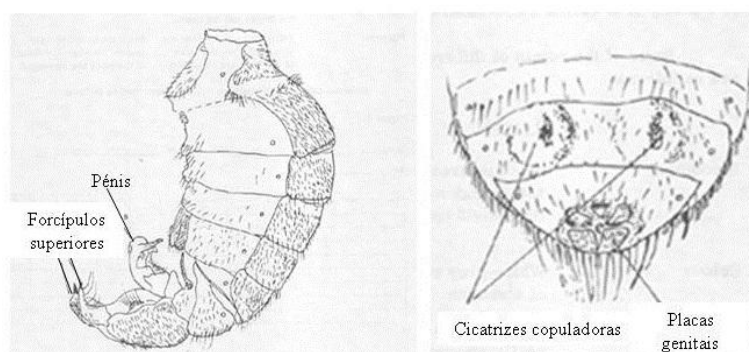


Figura 7. Genitália das glossinas do Grupo *palpalis*. À esquerda encontra-se a genitália do macho e à direita a genitália da fêmea (Adaptado de http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/LivProd/chapter23.htm#P15_422, 19 de Julho de 2011).

Embora uma fêmea de *Glossina* sp. possa dar origem, no máximo, a 20 descendentes durante a sua vida reprodutiva, a média é de cerca de oito descendentes em colónias laboratoriais e, provavelmente, dois descendentes na Natureza (Gooding & Krafur, 2005). As glossinas fêmeas podem acasalar mais do que uma vez durante toda a sua vida (já observado em laboratório), no entanto, o seu primeiro acasalamento, com um único macho, é suficiente para a produção de toda a sua descendência (Despommier *et al.*, 2005; Fèvre *et al.*, 2006).

Consequentemente, as moscas tsé-tsé possuem uma taxa de reprodução muito baixa, mais próxima da taxa reprodutiva dos mamíferos do que da taxa reprodutiva de outros insectos. A estratégia de reprodução levada a cabo por estes dípteros aposta na longevidade da descendência contrariamente a outros insectos que apostam em posturas (ovos) em grande número, de uma só vez, e várias vezes durante a sua “curta” existência. Assim, as glossinas são designadas por estrategistas *k* enquanto que a maioria dos insectos são designados por estrategistas *r* (Leak, 1999).

As glossinas adultas, tanto machos como fêmeas, são estritamente hematófagas e podem alimentar-se provavelmente todos os dias se existirem hospedeiros disponíveis, possuindo uma esperança média de vida que pode ir de dois a três meses e, em condições óptimas de clima e disponibilidade de alimento, até quase um ano (Gooding & Krafur, 2005; Gooding *et al.*, 2005). A procura do hospedeiro para a realização de uma refeição sanguínea é determinada tanto por factores endógenos como exógenos. Os primeiros incluem a idade, o sexo e as exigências metabólicas como a fase do ciclo reprodutivo (Gooding *et al.*, 2005), enquanto os factores exógenos compreendem a temperatura, a humidade relativa, os estímulos visuais, olfactivos e mecânicos (Despommier *et al.*, 2005).

Uma vez que os locais de repouso e larviposição diferem, muitas vezes, dos locais onde se localizam os hospedeiros vertebrados (Gooding *et al.*, 2005), as glossinas têm necessidade de se dispersarem na busca de alimento. Na presença de hospedeiros, as glossinas efectuem voos curtos (< 5min) e dedicam em regra cerca de 15 a 30 minutos por dia a esta actividade (Gooding & Krafur, 2005; Gooding *et al.*, 2005). No entanto, as moscas tsé-tsé podem voar cerca de 4,5 a 9 km, por dia, numa série de voos curtos e aleatoriamente orientados. Quando estão privadas de alimento por longos períodos de tempo, elas tendem a dispersar-se por grandes distâncias, em busca de

hospedeiros, sendo capazes de ultrapassar barreiras geográficas de mais de 1 a 5 km e invadir áreas de onde tinham sido eliminadas (Gooding *et al.*, 2005).

1.2.3. Espécies e subespécies glossínicas com importância em medicina humana e veterinária

Apesar de todas as espécies de glossinas serem potencialmente vectoras de tripanossomas patogénicos, apenas algumas são consideradas vectores competentes e eficientes na transmissão de tripanossomas que afectam tanto o Homem como animais (Gooding & Krafur, 2005).

Nenhuma das espécies do Grupo *fusca* é vectora de tripanossomas com importância em medicina humana, embora *G. fusca* e *G. medicorum* sejam eficientes vectores de tripanossomas animais transmitindo, principalmente, *Trypanosoma vivax* (Leak, 1999; Despommier *et al.*, 2005). As espécies que constituem este Grupo são as que apresentam menor importância veterinária e epidemiológica (Afonso, 2000).

As espécies glossínicas do Grupo *morsitans* são vectoras competentes (Luna *et al.*, 2001), sendo todas potenciais vectores tanto de tripanossomas humanos como animais. No entanto, as subespécies *G. morsitans morsitans*, *G. morsitans submorsitans* e *G. morsitans centralis* são excepcionalmente boas vectoras de tripanossomas (Despommier *et al.*, 2005). Todas estas subespécies transmitem *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* e *T. simiae* a animais, mas apenas as subespécies *G. m. morsitans* e *G. m. centralis* transmitem *T. brucei brucei*, sendo também responsáveis pela transmissão de *T. b. rhodesiense*, tanto a humanos como a animais (Afonso, 2000). Implicadas na transmissão de *T. b. rhodesiense*, quer aos Humanos quer aos animais, estão também as espécies *G. pallidipes* e *G. swynnertoni* (Afonso, 2000; Guerrant *et al.*, 2005).

Das nove espécies e subespécies que constituem o Grupo *palpalis*, as subespécies pertencentes a *G. palpalis* e *G. fuscipes* são vectoras tanto de tripanossomas humanos como animais (Despommier *et al.*, 2005), embora outras espécies deste Grupo possam contribuir para o ciclo de transmissão, mas com menor importância epidemiológica. *Glossina fuscipes s.l.* é responsável pela transmissão de *T. vivax* e *T. simiae*, sendo a subespécie *G. fuscipes fuscipes* responsável pela transmissão de *T. b. rhodesiense* a animais e tenha sido responsável pela epidemia de THA ocorrida no Quênia (1964) e no Uganda (1970 – 1990) (Afonso, 2000). As subespécies *G. fuscipes*

fuscipes, *G. f. quanzensis* e *G. f. martini* são responsáveis pela transmissão de *T. b. gambiense* tanto ao Homem como a outros animais (Afonso, 2000), sendo os animais domésticos os maiores reservatórios da doença, neste caso específico. A maioria das espécies deste Grupo prefere condições peridomésticas tendo sido observadas associadas a aldeias (Despommier *et al.*, 2005).

De todas as espécies de *Glossina* sp., presentes na África Ocidental e Oriental, *G. palpalis* s.l. é provavelmente a que mais se adaptou ao clima, à vegetação e a diferentes hospedeiros vertebrados, incluindo o Homem, podendo encontrar-se numa grande variedade de ambientes rurais e periurbanos (Afonso, 2000). As subespécies do Grupo *palpalis* com maior relevância, do ponto de vista médico e veterinário, são *G. palpalis palpalis* e *G. p. gambiensis* uma vez que são as mais antropofílicas (Leak, 1999; Despommier *et al.*, 2005). Estas subespécies têm uma distribuição alopatrica (Krafsur & Endsley, 2002; Dyer *et al.*, 2009). *Glossina palpalis gambiensis* estende-se pela África Ocidental, do Senegal, a Este do Mali, Burkina Faso, Gana, Togo e Benin; estando limitada no Sul pela transição floresta-savana, onde é substituída pela subespécie *G. p. palpalis* (Solano *et al.*, 1999).

Glossina palpalis s.l. é o principal vector de tripanossomas humanos na África Ocidental e Central (Camara *et al.*, 2006; Ravel *et al.*, 2007), embora esteja também implicada na transmissão de tripanossomas a animais, nomeadamente domésticos, como *T. vivax*, *T. congolense*, *T. simiae* e *T. brucei brucei* (Afonso, 2000). Na savana sub-húmida da África Ocidental, *G. p. gambiensis* é o principal vector de tripanossomas humanos e animais (Bouyer *et al.*, 2010).

1.3. Controlo da tripanossomose Africana

A ausência de dados científicos concretos acerca da epidemiologia das tripanossomoses Africanas dificulta a construção de programas de controlo eficazes e sustentáveis (Hargrove, 2003; Fèvre *et al.*, 2006). Portanto, actualizar, precisar e compreender a informação relativa às tripanossomoses Africanas, é importante no planeamento e monitorização de actividades de controlo (Cecchi *et al.*, 2009; Simarro *et al.*, 2010).

A estratégia regional proposta em 2005 pela OMS para o controlo da THA visa eliminar a doença, enquanto problema de saúde pública, até 2015. Este objectivo pode

ser, eventualmente, atingido com recurso a vários métodos de controlo, todos eles visando reduzir a transmissão do parasita (Fèvre *et al.*, 2006). No entanto, apesar de se considerar que a eliminação da doença está em curso, este processo será longo uma vez que apenas 10% dos 60 milhões de indivíduos em risco está sob vigilância (Courtin *et al.*, 2008).

1.3.1. Métodos de combate ao parasita

Segundo Steverding (2008), a partir dos eventos históricos ocorridos no século XX, pôde aprender-se que a intervenção activa e sistemática na procura de novos casos ou passiva, tentando que os doentes possam dirigir-se, na primeira fase da doença, aos centros hospitalares adequados, combinada com o tratamento da doença, é um método indispensável para o controlo da THA. Contudo, poucos fármacos estão disponíveis para o tratamento e é, ainda hoje, difícil a sua selecção que é baseada não só na fase em que se encontra a doença mas, principalmente, no agente etiológico que a causa, ou seja, na forma *gambiense* ou *rhodesiense* (Brun *et al.*, 2010).

Para o tratamento da fase hemolinfática da THA causada pelo *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*, os fármacos utilizados são a pentamidina e a suramina, respectivamente. Para o tratamento da fase neurológica causada por ambas as subespécies parasitárias recorre-se ao melarsoprol, composto organo-arsénico com mais de 50 anos de existência e cujos efeitos secundários são extremamente graves e frequentes (Fèvre *et al.*, 2008; Brun *et al.*, 2010), sendo responsável pela morte de 4 a 12% dos pacientes tratados e com taxas de recaída em 3 a 10% dos casos (Stich *et al.*, 2003; Fèvre *et al.*, 2008). No entanto, e de um modo geral, todos estes fármacos são responsáveis por reacções adversas, embora os utilizados na fase inicial da doença sejam melhor tolerados.

O fármaco mais recente, com cerca de 20 anos, que é indicado apenas para o tratamento da fase neurológica da forma *gambiense* da THA é a eflornitina, registada no ano de 1990 (Simarro *et al.*, 2008). O tratamento com este fármaco apresenta, frequentemente, efeitos secundários, embora sejam menos graves que os causados pelo melarsoprol e, geralmente, reversíveis (Fèvre *et al.*, 2008; Simarro *et al.*, 2008). Embora a combinação deste fármaco com o nifurtimox (NECT) não tenha apresentado eficácia inferior, relativamente à utilização da eflornitina em monoterapia, continua longe do

ideal, uma vez que necessita de administração intravenosa com custos elevados e pessoal qualificado (Simarro *et al.*, 2008; Simarro *et al.*, 2011).

Um dos maiores desafios do momento é o desenvolvimento de um novo fármaco que assegure a sustentabilidade das medidas de controlos adoptadas, tendo o mesmo de ser seguro, acessível, eficaz para ambas as formas e para ambas as fases da doença e cujo modo de administração seja oral, dispensando assim pessoal qualificado. Um novo fármaco para administração oral, o DB289, está na fase final de teste clínico (Simarro *et al.*, 2008).

Em relação ao controlo da TAA, as intervenções incluem o tratamento e/ou a profilaxia das espécies animais infectadas e/ou que servem de reservatório. Existem apenas três fármacos anti-tripanososoma disponíveis actualmente: a diminazina, o brometo de homídio ou cloreto de homídio e o cloreto de isometamídio, sendo o primeiro utilizado apenas para o tratamento de animais infectados, enquanto os restantes possuem também efeito profiláctico (Fèvre *et al.*, 2006).

A ausência de vacinas contra as tripanossomoses Africanas, a toxicidade dos fármacos disponíveis, a complexidade dos tratamentos e a ameaça iminente do aparecimento de estirpes resistentes aos fármacos utilizados, impede a adopção de estratégias de controlo baseadas na quimioterapia preventiva e sugere a luta vectorial como o método mais desejável para o controlo eficaz destas doenças. Contudo, o controlo integrado, e de forma sustentada, contra a doença e o vector nunca deverá ser esquecido nem posto de parte (Despommier *et al.*, 2005; Simarro *et al.*, 2010; Vreysen *et al.*, 2011).

1.3.2. Métodos de combate ao vector

O controlo vectorial foi introduzido, em África, no início do século XX e incluiu o uso do método de Maldonado, ou processo do visco, de rondas de captura, de alguns tipos de armadilhas, a eliminação de animais silváticos que pudessem ser reservatório e a eliminação da vegetação favorável aos locais de repouso e larviposição das glossinas (Afonso, 2000; Steverding, 2008). Apesar dos dois últimos métodos estarem associados ao desaparecimento ou redução das moscas tsé-tsé, presentemente, não são aceites do ponto de vista ecológico (Hargrove, 2003), tendo deixado de ser praticados.

Actualmente, as medidas de combate contra o vector incluem o uso de insecticidas (pulverização aérea, impregnação de telas e banhos ou formulações aplicadas no gado), vários tipos de armadilhas (Fig.8) e a técnica da libertação de machos estéreis (SIT) (Gooding *et al.*, 2005; Camara *et al.*, 2006; Simarro *et al.*, 2008). Apesar de ter sido eficaz na eliminação de *G. pallidipes* na África do Sul e *G. morsitans centralis* no Okavango Delta (Botswana), a técnica de pulverização aérea necessita de um apoio económico e de infra-estruturas consideráveis (Allsopp & Phillemon-Motsu, 2002; Hargrove, 2003; Kgori *et al.*, 2006; Simarro *et al.*, 2008). As telas impregnadas com insecticidas e as armadilhas têm sido utilizadas em muitos países endémicos para a supressão efectiva de populações glossínicas, sendo estes os métodos mais recomendados pelo baixo custo e simplicidade inerentes à sua utilização. Embora não evitem a reintrodução das glossinas se não forem mantidos, estes métodos demonstraram ser eficazes no controlo das moscas tsé-tsé no Zimbabwe e Zâmbia, bem como, na construção de barreiras contra a invasão de glossinas na fronteira entre Moçambique e Norte do Zimbabwe (Hargrove, 2003; Simarro *et al.*, 2008).



Figura 8. Exemplo de armadilhas utilizadas no controlo de glossinas. A e C: armadilha bicónica e piramidal, respectivamente, desenvolvidas para espécies ribeirinhas como *Glossina palpalis*; B: armadilha *Epsilon* desenvolvida para espécies de savana como *G. pallidipes* e *G. morsitans* (adaptado de <http://www.nri.org/tsetse/FAQ/besttrap.html>, 6 de Abril de 2011).

A técnica dos machos estéreis consiste na introdução de machos previamente esterilizados, quimicamente ou através de radiações ionizantes, na Natureza. Este método tem como objectivo o acasalamento entre fêmeas selvagens e machos estéreis não gerando, portanto, descendência (Despommier *et al.*, 2005; Fèvre *et al.*, 2006). Este método foi aplicado com sucesso na erradicação de *Glossina austeni*, vector de *T. vivax*, da ilha de Unguja em Zanzibar (Fèvre *et al.*, 2006). No entanto, os seus custos económicos são elevados sendo necessária a libertação de cerca de 50 machos estéreis

por cada macho selvagem e a sua aplicação parece não ser viável em áreas onde coexistam diferentes espécies (Despommier *et al.*, 2005; Simarro *et al.*, 2008).

É importante desenvolver um controlo integrado que inclua o controlo vectorial combinado com o rastreio das populações e consequente tratamento, bem como, com uma maior abrangência por parte das equipas móveis para que a percentagem de casos não reportados seja reduzida, e para que haja apoio e participação das populações locais envolvidas, pois só assim será possível controlar a doença (Steverding, 2008). A erradicação de *G. palpalis palpalis* na ilha do Príncipe (S. Tomé) desenvolvida e descrita por Azevedo *et al.* (1962), é um caso de sucesso da aplicação de medidas de controlo integrado e representa uma chamada de atenção para a necessidade de desenvolver e aplicar medidas de controlo sustentáveis, com o objectivo de evitar a reintrodução do vector e a possível reemergência da doença.

1.4. Tripanossomoses e seus vectores na Guiné-Bissau

A Guiné-Bissau fica situada na costa Ocidental de África, mais concretamente no Golfo da Guiné, a 12° Norte e 15° Oeste (CIA, 2010). A sua superfície total é de 36125 km² dos quais 28120 km² constituem a superfície emersa devido à baixa elevação do país, relativamente ao nível médio do mar. Pelo facto das marés penetrarem até cerca de 150 km, algumas áreas ficam parcial ou totalmente inacessíveis durante parte do ano. Este país possui um clima tropical húmido e é caracterizado pela presença de galerias florestais nas margens dos rios e linhas de água (floresta higrófila), savanas que ocupam a maior extensão do país e povoamentos aquáticos como mangais, pântanos, rios e lagoas (Badjana, 2004).

Posto isto, não é de surpreender que a maior abundância relativa e densidade de glossinas encontradas neste país seja *G. p. gambiensis*, sendo esta subespécie a mais largamente difundida, uma vez que encontra, em praticamente todo o território, o conjunto de condições necessárias à sua sobrevivência (Almeida, 1950; Azevedo, 1954; Badjana, 2004). São também encontradas, apesar de apresentarem uma densidade bastante inferior, *G. m. submorsitans*, *G. longipalpis* (Cruz Ferreira, 1947; Almeida, 1950; Badjana, 2004) e *G. fusca*, embora a última referência a esta espécie date de 1949 (Almeida, 1950). A densidade de *G. longipalpis* é superior na época das chuvas, não

havendo diferenças significativas nas densidades de *G. m. submorsitans* quando capturadas quer na época seca quer na época das chuvas (Cruz Ferreira, 1947).

Os parasitas encontrados em vários estudos realizados na Guiné-Bissau dizem respeito às espécies *T. brucei s.l.*, *T. congolense*, *T. vivax* e *T. grayi*, sendo este último parasita de répteis (Cruz Ferreira, 1947; Almeida, 1950). Apesar de não se saber, com toda a certeza, se *T. brucei brucei* se encontra neste país, é possível afirmar a existência de *T. b. gambiense*, uma vez que trabalhos anteriores, efectuados até meados do século passado, detectaram uma percentagem elevada de doentes com lesões nervosas, incipientes ou bem definidas (Cruz Ferreira, 1947).

Pelo que se conhece acerca da doença do sono na Guiné-Bissau, o flagelo afectava todo o território com prevalências parasitárias oscilando entre 0,1 e 5%. Os aldeamentos estavam em estreito contacto com a Natureza, encontrando-se largamente disseminados por todo o território. Por este motivo e ainda por consequência das suas deslocções constantes para os locais de abastecimento de água e actividades agrícolas, o Homem tinha muitas probabilidades e possibilidades de contrair a infecção (Azevedo, 1954).

Cruz Ferreira (1947) refere “*A doença do sono na Guiné-Bissau é uma afecção antiga e que tem tido evolução arrastada...*”. Por este motivo foi criada em 1945 uma missão de estudo e combate à doença do sono que teve como designação *Missão de Combate da Doença do Sono na Guiné Portuguesa*, cujo chefe foi o Prof. Fernando da Cruz Ferreira (Professor no Instituto de Medicina Tropical). Esta missão era constituída por três secções: secção de investigação científica, secção de recenseamento e tratamento dos doentes e secção de combate às glossinas; estando previsto que toda a população fosse observada pelo menos uma vez por ano (Azevedo, 1954). Foram registados indivíduos infectados em quase todas as povoações observadas (Cruz Ferreira, 1947). Os trabalhos levados a cabo pela missão levaram a uma redução visível do número de casos registados, passando de 2169 casos em 1952 (Azevedo, 1954) a 4 em 1987 (Grácio, 1999). No entanto, em 1962 a prevalência da doença do sono já tinha diminuído para um valor de 0,07% (Azevedo, 1964).

De acordo com Azevedo (1954), os índices de infecção das glossinas na Guiné-Bissau eram a favor de um estado estacionário da doença. Contudo, com a declaração da independência em 1973/74, o país entrou numa instabilidade política com guerras

civis e golpes militares, tendo a última tentativa ocorrido a 1 de Abril de 2009. (Rizzi, 2010). Esta instabilidade política, juntamente com a instabilidade social e económica, repercutiu-se nos programas de saúde tanto nacionais como de cooperação, na diminuição dos recursos, bem como, do pessoal especializado. Todos estes factores levaram ao abandono dos programas de controlo e à reemergência da doença em alguns países endémicos como Angola (Simarro *et al.*, 2008). No entanto, há cerca de 30 anos que não se fazem estudos, no que diz respeito à doença, na Guiné-Bissau, não se sabendo neste momento qual a situação do país face às tripanossomoses Africanas, sendo por isso considerado um país de estatuto mal esclarecido (Grácio, 1999; Afonso & Grácio, 2008).

1.5. Microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos como *simple sequence repeats* (SSR) ou *short tandem repeats* (STR), são sequências de DNA repetitivo compostas por pequenos motivos, cujo tamanho pode ir de 1 a 6 pb. Estas sequências, abundantes e bem distribuídas pelo genoma, têm sido detectadas em todos os organismos analisados até ao momento e apresentam frequências muito superiores às esperadas (Krafsur *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002).

Os microssatélites estão entre os tipos de sequências de DNA mais variáveis do genoma sendo caracterizados pela elevada heterozigotia e pela presença de múltiplos alelos (Ellegren, 2004). Os microssatélites são, de todos os marcadores genéticos, os mais utilizados em estudos evolutivos e ecológicos pela sua ubiquidade, elevado nível de polimorfismo e co-dominância (Oosterhout *et al.*, 2004). O tamanho dos fragmentos correspondentes aos alelos microssatélites variam dentro de um curto intervalo, não ultrapassando os 500 pb, o que faz com que estas sequências sejam relativamente fáceis de genotipar após amplificação em PCR (Queller *et al.*, 1993), outro factor que os torna óptimos marcadores genéticos. Outra propriedade conveniente dos microssatélites é o facto de *loci* homólogos poderem ser amplificados em espécies relacionadas com recurso aos mesmos *primers* (Jarne & Lagoda, 1996).

Os microssatélites são uma importante ferramenta para o mapeamento de genomas. São muito utilizados no diagnóstico biomédico de algumas doenças genéticas, uma vez que determinados alelos microssatélites estão associados a mutações ocorridas

em regiões codificantes do DNA responsáveis por determinadas doenças. São também muito úteis em análises forenses ou de parentesco e podem ainda ser utilizados na avaliação da história demográfica (*e.g.* evidências de *bottlenecks* em populações), do tamanho efectivo de populações e da magnitude do fluxo genético entre populações (Halverson & Basten, 2005; Kayondo *et al.*, 2005; Cankovic *et al.*, 2006; Dawson *et al.*, 2006).

Apesar da sua ampla versatilidade, os microssatélites possuem determinadas características que podem limitar a sua utilização como marcadores genéticos, tais como a homoplasia, a restrição do comprimento dos alelos e a ocorrência de alelos nulos (Schlötterer & Pemberton, 1998). A homoplasia ocorre quando alelos diferentes de determinado *locus* são idênticos em estado mas não em descendência, isto é, têm o mesmo tamanho mas não tiveram origem no mesmo alelo ancestral (Estoup *et al.*, 2002), o que pode influenciar inferências filogenéticas com base nestes marcadores.

Os alelos nulos são alelos não amplificados devido à existência de mutações nas regiões flanqueantes complementares aos *primers* utilizados para amplificar um dado *locus*. Estas mutações podem inibir a ligação do *primer*, resultando numa redução ou perda completa de produto amplificado (Callen *et al.*, 1993). Outras causas possíveis para a ocorrência de alelos nulos incluem a amplificação preferencial por alelos pequenos ou a ocorrência de *slippage* durante a amplificação em PCR (Chapuis & Estoup, 2007). Os alelos nulos podem resultar em falhas de amplificação (quando em homozigotia) ou em falsos genótipos homozigóticos (quando em heterozigotia).

1.6. Estudos de genética populacional em insectos vectores

Pensa-se que a variação genética entre populações de insectos vectores afecte a susceptibilidade dos mesmos à infecção por parasitas e, consequentemente, a transmissão de muitas doenças parasitárias, a um nível macrogeográfico e microgeográfico (Riehle *et al.*, 2011; White *et al.*, 2011). Assim, estudos genéticos podem ajudar a compreender melhor o nível de diferenciação das populações das moscas tsé-tsé e a transmissão de tripanossomas e, por conseguinte, a epidemiologia da THA e TAA (Solano *et al.*, 2000; Camara *et al.*, 2006; Bouyer *et al.*, 2010), fornecendo informação útil sobre a distribuição e ecologia das subpopulações de glossinas, estimativas relativas à dispersão espacial e temporal, relações taxonómicas entre

espécies/subespécies, relações entre o vector e o parasita e identificação de genes de resistência a insecticidas (Krafsur *et al.*, 2001; Gooding & Krafsur, 2005; Camara *et al.*, 2006). Estes estudos permitem ainda o desenvolvimento de métodos que levem à supressão das populações glossínicas ou que previnam a transmissão do parasita (Solano *et al.*, 2000; Gooding & Krafsur, 2005; Bouyer *et al.*, 2010).

De um modo geral, o estudo genético de vectores permite estimar níveis de diferenciação genética, tamanho das populações e estrutura reprodutiva; entender os mecanismos evolutivos que regulam a variação genética e os processos que permitem a divergência entre as espécies; bem como, determinar a origem de processos adaptativos (Hartl, 2000). É também possível perceber a evolução das espécies, uma vez que os padrões de acasalamento, o tamanho da população e o fluxo migratório influenciam a estrutura genética (De Meeûs *et al.*, 2007; Solano *et al.*, 2009).

1.7. Estudos de genética de populações de *Glossina* spp.

Há duas décadas, pouca era a informação existente acerca da variabilidade intraespecífica ou estruturação das populações de glossinas. No entanto, com o desenvolvimento de marcadores moleculares e técnicas de genotipagem para glossinas, os estudos genéticos nestes dípteros foram impulsionados. Actualmente, existem já microssatélites isolados para várias espécies de glossinas (Solano *et al.*, 1997), tais como glossinas pertencentes ao Grupo *morsitans*, *G. p. palpalis*, *G. p. gambiensis* e *G. fuscipes fuscipes* (Krafsur, 2009).

1.7.1. *Glossina palpalis* sspp.

Glossina palpalis gambiensis tem sido muito estudada com recurso a microssatélites e/ou mtDNA, com o objectivo de analisar a variabilidade genética intraespecífica, determinar diferenças genéticas entre populações provenientes de regiões ou países diferentes, determinar o grau de isolamento entre populações e estimar tamanhos efectivos populacionais (Solano *et al.*, 1999; Solano *et al.*, 2000; Luna *et al.*, 2001; Marquez *et al.*, 2004; Camara *et al.*, 2006; Solano *et al.*, 2009; Bouyer *et al.*, 2010). Verificou-se fluxo genético restrito entre populações de *G. p. gambiensis* de regiões separadas por 30 km de terra ou 5 km de mar, estando as populações em causa diferenciadas geneticamente. Os resultados obtidos neste mesmo trabalho sugerem

défice de heterozigóticos em alguns microssatélites, provavelmente pela presença de alelos nulos (Camara *et al.*, 2006). No estudo realizado por Solano e colaboradores (2000), foi também demonstrado que as populações analisadas estavam diferenciadas geneticamente ($F_{ST} = 0,059$, $P < 0,0001$) e, de acordo com o valor de F_{IS} global (0,163), concluiu-se que havia défice de heterozigóticos. As subpopulações determinadas estavam também infectadas com diferentes espécies de tripanossomas. Além de ausência de fluxo genético e diferenciação genética significativa, Solano e colaboradores (2009) verificaram, pela determinação do tamanho efectivo populacional ($10 < N_e < 30$), que a população de *G. p. gambiensis* da Guiné Conacri sofreu um *bottleneck* recente e/ou variações no sucesso reprodutivo dos indivíduos.

De todos os trabalhos acima citados, apenas o de Bouyer e colaboradores (2010) não detectou diferenciação genética entre populações de bacias fluviais. A ausência de diferenciação genética pode ser devida à inexistência de isolamento ou ao facto do mesmo ser tão recente que não seja possível detectá-lo. No entanto, as frequências genéticas obtidas para *G. p. gambiensis* neste estudo foram coincidentes com os dados relativos à capacidade de dispersão desta subespécie, o que indicou que estas glossinas são capazes de percorrer 2 a 5 km de savana situada entre duas bacias fluviais.

Com o objectivo de perceber a estrutura genética de *G. palpalis palpalis* proveniente do maior foco activo de doença do sono da Costa do Marfim (Bonon), a população desta subespécie foi estudada com recurso a microssatélites (Ravel *et al.*, 2007). Foram encontrados défices de heterozigóticos dentro da população, o que pode ser explicado pelo efeito de *Wahlund* uma vez que se verificou que esta população estava subdividida em vários *clusters* ($F_{ST} = 0,29$). Tendo como finalidade determinar a estrutura genética populacional e relações filogenéticas, populações de *G. p. palpalis* da Guiné Equatorial e República Democrática do Congo foram estudadas com recurso a mtDNA, rDNA (*ITS1*) e microssatélites (Dyer *et al.*, 2009). Concluiu-se que *G. p. palpalis* da Guiné Equatorial é uma subespécie distinta da *G. p. palpalis* descrita na África Ocidental e RDC, partilhando, no entanto, um ancestral comum com *G. p. palpalis* da RDC. A análise de microssatélites revelou níveis de diferenciação moderados mas significativos entre as populações da Guiné Equatorial, não indicando contudo que algum dos focos estivesse fortemente isolado.

Por fim, um estudo recente foi desenvolvido em populações de *G. p. palpalis* dos Camarões e RDC, recorrendo a microssatélites (Melachio *et al.*, 2011). Os resultados foram concordantes com estudos anteriores tendo-se verificado défice de heterozigóticos ($F_{IS} = 0,176$, $P < 0,001$), provavelmente pela presença de alelos nulos. Verificou-se também que as populações estudadas eram compostas por subpopulações panmícticas com isolamento por distância.

1.7.2. Outras populações de *Glossina* spp.

Embora não se verifiquem grandes diferenças relativamente aos estudos já abordados, outras espécies ou subespécies glossínicas foram também geneticamente estudadas. Microssatélites e mtDNA foram utilizados para estudar a estrutura genética de *G. morsitans centralis* do Botswana, Namíbia, Tanzânia e Zâmbia (Krafsur *et al.*, 2001), tendo-se obtido um elevado grau de diferenciação genética entre as populações, tanto para mtDNA ($F_{ST} = 0.866$ e) como para os microssatélites ($0.15 < F_{ST} < 0.225$), e observado uma correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas. Verificou-se também que todas as populações estão próximas do equilíbrio mutação-deriva genética após um *bottleneck* seguido de uma expansão populacional. O mesmo autor estudou a estrutura de *G. pallidipes* da África Oriental e Sul, mas com recurso não só a mtDNA e microssatélites como também a aloenzimas, com o objectivo de comparar os resultados obtidos com os respectivos marcadores genéticos (Krafsur, 2002). Concluiu-se que as distâncias genéticas aumentam com o aumento das distâncias geográficas, tal como no estudo anterior, sendo este resultado similar entre mtDNA e microssatélites mas não correlacionável com os resultados obtidos por aloenzimas. Isto provavelmente aconteceu pelo facto da diversidade nestes últimos marcadores ser conservada mesmo durante a ocorrência de um *bottleneck*, demonstrado pela análise com mtDNA e microssatélites, o que demonstra que as aloenzimas não são selectivamente neutras.

A estrutura populacional de *G. morsitans submorsitans* e *G. m. morsitans* de vários países da África Oriental foi também estudada com recurso a microssatélites (Krafsur & Endsley, 2002). De acordo com trabalhos anteriores similares, foi obtida uma elevada diferenciação genética dentro das populações de *G. m. submorsitans* ($F_{ST} = 0.166$) e *G. m. morsitans* ($F_{ST} = 0.185$), bem como entre as populações das diferentes

subespécies. Provavelmente, os níveis de diferenciação genética verificados não se devem a restrições ao fluxo genético entre as subespécies, mas sim à alopatria existente em *G. morsitans s.l.*

Na maioria destes estudos os resultados obtidos foram discutidos como implicações na implementação de medidas de controlo integrado (Solano *et al.*, 2000; Marquez *et al.*, 2004; Camara *et al.*, 2006; Dyer *et al.*, 2009; Bouyer *et al.*, 2010), bem como, de medidas de controlo que envolvam uma abordagem genética (Krafsur *et al.*, 2001; Ravel *et al.*, 2007). No entanto, eles permitem também conhecer a epidemiologia da doença (Ravel *et al.*, 2007), avaliar a eficácia de métodos de captura e amostragem em campo, assim como determinar quais os melhores métodos para o estudo genético de vectores (Krafsur, 2002; Krafsur & Endsley, 2002).

1.8. Objectivos do estudo

O presente trabalho tem como objectivo principal avaliar a estrutura genética de populações de *Glossina palpalis gambiensis* da Guiné-Bissau, com base na análise de DNA microssatélite. Mais especificamente, pretende-se:

- ▶ Estudar parâmetros de diversidade genética;
- ▶ Avaliar níveis de diferenciação genética entre populações continentais e entre estas e as populações das regiões insulares;
- ▶ Interpretar os resultados obtidos no estudo genético em termos da sua repercussão na epidemiologia das tripanossomoses e do controlo do vector.

2. MATERIAIS E **MÉTODOS**

2.1. Caracterização dos locais de captura das glossinas, identificação morfológica e conservação dos exemplares capturados

A República da Guiné-Bissau fica situada na costa Ocidental de África, fazendo fronteira a Norte com o Senegal, a Este e Sudeste com a Guiné Conacri e a Sul e Oeste com o oceano Atlântico. Além do território continental, este país integra cerca de oitenta ilhas que constituem o Arquipélago de Bijagós, cuja ilha principal, Bubaque, se situa a cerca de 55 km do continente (Fig.9) (CIA, 2010).

O país estende-se por uma área com 36126 km², de baixa altitude, cujo ponto mais elevado está a 300 metros acima do nível do mar. O interior é constituído por savanas e o litoral por uma planície pantanosa (mangais ou tarrafes). Situada aproximadamente a meia distância entre o Equador e o Trópico de Câncer, a Guiné-Bissau tem um clima tropical húmido, em que o período das chuvas alterna com a estação seca (CIA, 2010). A estação das chuvas estende-se de Junho até meados de Novembro, com maior pluviosidade em Julho e Agosto, enquanto a estação seca corresponde aos restantes meses do ano, sendo os meses de Dezembro e Janeiro os mais frescos. No entanto, as temperaturas são elevadas durante todo o ano (temperatura média anual: 27°C).



Figura 9. Mapa da Guiné-Bissau. Regiões onde as glossinas deste estudo foram capturadas (adaptado de Google™ Earth).

Neste trabalho, foram analisados exemplares de *Glossina palpalis gambiensis* capturados em cinco regiões da Guiné-Bissau: Biombo, Bijagós, Bolama, Gabú e Tombali, as quais estão representadas na Figura 9. A região de Biombo representa uma área peri-urbana e fica situada entre a região de Cacheu a Norte, a região de Oio a Este e

o oceano Atlântico a Sul, distando *ca.* 60 km do Sector Autónomo de Bissau e sendo, no seu conjunto, a região mais próxima da capital. As regiões de Bolama e Bijagós constituem a parte insular da Guiné-Bissau, que compreende o arquipélago de Bijagós e a Ilha de Bolama, região insular adjacente à região de Quinara e separada desta pelo canal de Bolama com *ca.* 1km de largura. A região de Tombali representa uma zona de floresta tropical húmida e fica situada na parte mais a Sul do país, sendo limitada a Norte pelas regiões de Quinara, Bafatá e Gabú e a Sul e Oeste pelo oceano Atlântico. A região de Gabú representa a zona de savana e é a região mais a leste e interior do país, fazendo fronteira a Norte com o Senegal, a Este e a Sul com a Guiné Conacri e a Oeste com a região de Bafatá (Badjana, 2004).

O material biológico utilizado neste estudo foi obtido no âmbito de uma tese de Mestrado em Parasitologia Médica do IHMT (Badjana, 2004). As glossinas foram capturadas na época seca, entre 5 de Abril e 19 de Maio de 2004, através de armadilhas do tipo piramidal (Gouteux & Lancien, 1986). Após a recolha e morte das glossinas com clorofórmio, procedeu-se à separação das mesmas por sexo e conservaram-se em tubos de plástico, contendo etanol 80%, devidamente etiquetados: data, local e número de ordem do biótopo. Todos os exemplares capturados e conservados foram transportados para o IHMT para identificação morfológica das espécies e subespécies com base em chaves dicotómicas (Badjana, 2004).

Após identificação morfológica das espécies e subespécies, as glossinas identificadas foram agrupadas por local de captura, sexo e subespécie e mantidas em tubos plásticos devidamente etiquetados, contendo etanol 90%, conservados no escuro e à temperatura ambiente até Setembro de 2010.

2.2. Preparação das glossinas para extracção de DNA

Após separação e organização dos tubos contendo as glossinas, das diferentes regiões e localidades prospectadas, procedeu-se ao corte longitudinal das mesmas para posterior extracção de DNA, tendo sido utilizada a seguinte metodologia:

a. Transferiram-se todas as glossinas de um mesmo tubo para um recipiente com etanol 90% e retirou-se cada exemplar, um a um, para uma lâmina de vidro previamente colocada sobre a platina do estereomicroscópio (Zeiss Stemi 2000, ampliação: 8x).

b. Cada glossina foi seccionada utilizando-se uma pinça entomológica e um bisturi, previamente esterilizados à chama (lâmparina). Em primeiro lugar, seccionou-se transversalmente a cabeça e a genitália (últimos segmentos abdominais) e, de seguida, o tórax e o abdómen foram seccionados longitudinalmente (Fig.10).



Figura 10. Dissecção de *Glossina palpalis gambiensis* para extracção de DNA. À esquerda, encontram-se os últimos segmentos abdominais, após secção transversal. À direita, encontra-se a cabeça. Ao centro, as duas metades do tórax e abdómen, após secção longitudinal. (fotografias tiradas ao estereomicroscópio Wild Heerbrugg – Highlight 2100, ampliação: 90x; com recurso a uma máquina fotográfica digital Canon Digital IXUSi zoom).

Para cada glossina, a cabeça e metade do tórax e abdómen foram armazenados num microtubo 1,5ml contendo etanol 90% e conservado à temperatura ambiente até à extracção de DNA. A genitália e a outra metade do tórax e abdómen foram conservados, igualmente, num microtubo de 1,5ml contendo etanol 90%. Este material ficou de reserva para eventual confirmação da espécie/subespécie ou para repetição do processo de extracção de DNA. Os microtubos foram devidamente etiquetados com a mesma identificação para os dois tubos, por glossina, e registados numa base de dados

2.3. Extracção, quantificação e pureza do DNA genómico

A extracção de DNA foi realizada de acordo com um kit para extracção de DNA de tecidos animais (DNeasy® Blood & Tissue Kit, Qiagen). A extracção foi realizada a partir de uma metade (cabeça + tórax e abdómen) de cada glossina, individualmente, que foi homogeneizada num microtubo de 1,5ml com auxílio de uma seta plástica. A metodologia utilizada foi a do protocolo descrito pelo fabricante e teve como princípio a lise celular, com o objectivo de expor o DNA, com posteriores lavagens e eluição do produto em coluna de cromatografia. Por extracção de cada 10 amostras foi incluído um

branco (*i.e.* sem material biológico). Todas as amostras de DNA foram conservadas a -20°C até posterior utilização.

Para avaliar a eficiência do procedimento de extracção, bem como a ausência de contaminações, todas as amostras e respectivos brancos foram analisadas num espectrofotómetro (Nanodrop® 1000, ThermoScientific), para determinação da concentração de DNA e dos valores de pureza, sendo os últimos obtidos através do quociente entre os valores de absorvância a 260 e 280nm.

Para as amostras de DNA que apresentaram valores baixos de concentração e pureza (juntamente com os brancos), foi efectuada uma amplificação por PCR de uma sequência conservada em *Glossina* spp. do gene da α -tubulina (Hao *et al.*, 2003), de modo a avaliar a sua utilidade como DNA *template*, bem como a presença de inibidores de PCR.

A amplificação foi realizada com recurso ao kit *pureTaq Ready-To-Go PCR Beads* (Illustra™), contendo 2µl de amostra de DNA numa diluição de 1:10 em ddH₂O estéril e *primers* GmTubF 0,400µM (5'-ACGTATTCATTTCCCTTTGG-3') e GmTubR 0,400µM (5'-AATGGCTGTGGTGTGGACAAC-3'). As condições da reacção de PCR consistiram numa desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 50°C durante 40 segundos e extensão a 72°C durante 40 segundos, terminando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. A conservação dos produtos amplificados foi efectuada a 4°C.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2% (Promega Agarose LE, *Analytical Grade*) corado com brometo de etídeo 10mg/ml (Plusone) em TBE 1x (Sigma). As amostras foram carregadas com 2,5µl de *loading buffer* (Fermentas) e aplicados 10µl no gel. Usaram-se 8µl de marcador *DNA ladder* 100pb (Fermentas), tendo a electroforese decorrido a 140V durante cerca de uma hora. A visualização das bandas foi efectuada em transiluminador de luz UV e fotografada num sistema Uvidoc® (Uvitec).

2.4. Genotipagem de microssatélites

O facto de se desconhecer a localização cromossómica da maioria dos *loci* microssatélites em estudo e de modo a evitarem-se problemas de ausência de

heterozigotia, em *loci* localizados no cromossoma X, nos machos, apenas as glossinas fêmeas foram analisadas no presente estudo.

Tabela 1. Características dos *loci* microssatélites em estudo.

<i>Locus</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'→3')	Repetição
<i>Pgp01</i>	F: FAM-TCTCACGCAATTA AAAATCGC R: TGTTGAGTACACTTTTAAGCCTATGA	(GT) ₉
<i>Pgp13</i>	F: HEX-AAAATAACGAACGGGTGCAG R: GACGCACGCACATAGTTACG	(GT) ₁₇ TT(GT) ₃
<i>Pgp22</i>	F: HEX-GCTACTGCGACTGCTACTGC R: CAAGGAATTGGTTCTGCCAT	(GT) ₉
<i>Pgp28</i>	F: NED-TCAAATTGTTCCCATCAAGGA R: ATCGTTTTTAAAGGGTTTTAAGTTT	(GT) ₄ GC(GT) ₇
<i>Pgp35</i>	F: HEX-AATACGGGCATGGATAAGCA R: TCGGAGGAGAGCTTTTTCAG	(GT) ₁₄
<i>Gmm08</i>	F: FAM-CGCGCTTCAATGTTTGCTTTC R: TGCAGATGCAATGCGGAGAG	(GA) ₁₁
<i>Gms02</i>	F: NED-GCTTTTCTCGTCCCATAA R: GCGTTGTTGATGACTGTG	(CAG) ₈
<i>Gms29</i>	F: FAM-AACTATTGCTTGGGCTCAC R: ATGTGGCGACGATGA	(CAG) ₆ (CAA) ₇
<i>Gp133</i>	F: ATTTTTCGTCAACGTGA R: HEX-ATGAGGATGTTGTCCAGTTT	(CAG) ₁₂
<i>Pgp08</i>	F: NED-GTACGTGTGAGGGCCAGAAT R: TTGAAAATCCATCCCCTAT	(GT) ₁₀
<i>Pgp11</i>	F: NED-GTTCGTGGTTGTCTCTGTGT R: GCGTTTCGAAAGGAGTAACG	(GT) ₁₀
<i>Pgp17</i>	F: NED-TGGCAAACCTCTTCCATGTTT R: AAGGCGGCTCTCTTAAGC	(GT) ₂₁

Legenda: Os *loci* com sufixo *Pgp* foram isolados de *Glossina palpalis palpalis* por Luna *et al.* (2001); os *loci* com sufixos *Gmm*, *Gms* e *Gp* foram isolados de *G. morsitans morsitans*, *G. morsitans submorsitans* e *G. pallidipes*, respectivamente, por Baker & Krafur (2001). Todos os *primers forward* (F), com excepção do *Gp133* que está marcado em *reverse* (R), estão marcados fluorescentemente em 5' com FAM, HEX ou NED. Os *primers* marcados com os fluorocromos FAM e HEX foram sintetizados na MWG – Biotech AG e os marcados com NED na Applied Biosystems UK.

Foram analisados um total de doze microssatélites (Baker & Krafur, 2001; Luna *et al.*, 2001; Tab.1) Destes, um grupo de nove *loci* foi genotipado a partir de reacções de PCR em *multiplex* com base em protocolos previamente optimizados

(Furtado, 2006a). Os restantes três *loci* foram genotipados com base em reacções de PCR simples (*i.e.* uma reacção por *locus*) de acordo com protocolos descritos por Furtado (2006b). No entanto, houve alterações a estes procedimentos: os *loci Pgp11* e *Pgp17* passaram a ser genotipados a partir de reacções de PCR simples e os *loci Pgp22* e *Pgp28*, passaram a ser genotipados em reacções de PCR *multiplex*, constituindo o grupo D (Tab.2 e Tab.3).

A análise do tamanho dos fragmentos amplificados para cada *locus* foi efectuada por electroforese capilar num sequenciador automático (ABI 3700 Applied Biosystems, USA), na *Yale DNA Analysis Facility* (EUA). Para o efeito, usou-se um dos *primers* (*forward* ou *reverse*), nas reacções de PCR, marcado com fluorocromo na extremidade 5' (6-FAM, HEX ou NED).

2.4.1. Microssatélites em PCR *multiplex*

Os nove microssatélites genotipados por este procedimento foram agrupados em quatro grupos *multiplex*. A composição das misturas de reacção e as condições de amplificação para cada grupo estão descritas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Composição das misturas de reacção para amplificação dos grupos de *loci* microssatélites formados através de PCR *multiplex*.

Reagentes			Concentração final
ddH ₂ O			---
Tampão (Promega)			1x
Cloreto de Magnésio (Promega)			1,5 mM
dNTPs (Promega)			0,2 mM
Primers F e R*	Grupo A	<i>Pgp01</i>	0,375 µM
		<i>Pgp35</i>	0,125 µM
	Grupo B	<i>Gmm08</i>	0,25 µM
		<i>Gms02</i>	0,125 µM
		<i>Pgp13</i>	0,125 µM
		<i>Gms29</i>	0,125 µM
	Grupo C	<i>Gp133</i>	0,25 µM
		Grupo D	<i>Pgp22</i>
	<i>Pgp28</i>		0,25 µM
	<i>Taq</i> DNA polimerase (Promega)		
DNA <i>Template</i>			1 µl diluição (1/10)
Volume Total			20 µl

*concentração para cada *primer*.

Tabela 3. Condições de amplificação dos grupos de *loci* microssatélites formados para PCR *multiplex*.

		Temperatura		Tempo	
Desnaturação inicial		94°C		3 min	
35 Ciclos	Desnaturação	94°C		30 seg	
	Annealing	Grupo A	56°C	30 seg	
		Grupo B	56°C		
		Grupo C	50°C		
		Grupo D	50°C		
	Extensão			Grupo A	60 seg
		72°C		Grupo B	30 seg
				Grupo C	60 seg
		Grupo D	30 seg		
Extensão final		72°C		10 min	

2.4.2. Microssatélites em PCR simples

A composição das misturas de reacção e as condições de amplificação por PCR, para os três microssatélites amplificados individualmente, encontram-se sumariadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Composição das misturas de reacção para amplificação dos *loci* microssatélites através de PCR simples.

Reagentes	Concentração final
ddH ₂ O	---
Tampão (Promega)	1x
Cloreto de Magnésio (Promega)	1,5 mM
dNTPs (Promega)	0,2 mM
<i>Pgp08</i>	0,125 µM
<i>Primers F e R*</i> <i>Pgp11</i>	0,125 µM
<i>Pgp17</i>	0,25 µM
<i>Taq</i> DNA polimerase (Promega)	0,5 U/µl
DNA <i>Template</i>	1 µl diluição (1/10)
Volume Total	20 µl

*concentração para cada *primer*.

Tabela 5. Condições de amplificação dos *loci* microssatélites formados para PCR simples.

		Temperatura		Tempo	
Desnaturação inicial		94°C		3 min	
35 Ciclos	Desnaturação	94°C		30 seg	
	Annealing	Pgp08	54°C	30 seg	
		Pgp11	56°C		
		Pgp17	56°C		
	Extensão			Pgp08	30 seg
		72°C		Pgp11	60 seg
				Pgp17	60 seg
Extensão final		72°C		10 min	

2.4.3. Qualidade da amplificação em PCR *multiplex* e PCR simples

Com o objectivo de verificar a eficiência das reacções de PCR, uma parte dos produtos amplificados foi visualizada em gel de agarose 2% (Lonza – Agarose LE, Seakem®) corado com brometo de etídeo 10mg/ml (Sigma) em TBE 1x (Applichem – TBE *buffer* 10x). As amostras foram carregadas com 2µl de *loading buffer* (Promega – Blue/orange 6x) e aplicados 10µl no gel. Usaram-se 5µl de marcador *DNA ladder* de peso molecular 100pb (Promega), tendo a electroforese decorrido a 140V durante cerca de 45 minutos. A visualização das bandas foi efectuada em transiluminador de luz UV e fotografada num sistema Uvidoc® (Uvitec).

2.4.4. Análise de fragmentos

As amostras para análise de fragmentos foram preparadas em microplacas de 96 poços de 200µl cada. Foi colocado em cada poço 1µl de produto amplificado e 10µl de formamida *Hi-Di* (Sigma). Foi ainda adicionado 0,5µl de marcador de peso molecular a cada poço (*internal size standard* GeneScan ®-500 [ROX], Applied Biosystems) imediatamente antes da electroforese capilar.

A análise dos electroferogramas obtidos na análise de fragmentos em sequenciador automático foi realizada com auxílio do software *GeneMarker* versão 1.4 (SoftGenetics, UK), permitindo uma estimativa do tamanho dos alelos (em pares de bases) com base no marcador interno de peso molecular.

2.5. Análise estatística dos dados genéticos

Os dados genotípicos obtidos para *G. p. gambiensis* da Guiné-Bissau foram analisados em conjunto com os dados de uma amostra de *G. p. palpalis* da Guiné Equatorial, trabalho realizado por Furtado (2006b). Esta amostra, constituída por 41 indivíduos, foi capturada na localidade de Rio Campo em Agosto de 2003 (Furtado, 2006a).

Os genótipos por indivíduo e *locus* foram organizados numa base de dados em *Excel*[®] (*Microsoft*), contendo o tamanho dos alelos em pares de bases e o respectivo número de repetições.

2.5.1. Diversidade genética

Com o objectivo de caracterizar a diversidade genética das populações de *G. p. gambiensis* da Guiné-Bissau, os parâmetros que se seguem foram determinados com base nos genótipos obtidos para os *loci* microssatélites.

2.5.1.1. Frequências alélicas

A frequência alélica consiste na proporção de um dado alelo numa população de N indivíduos, para um determinado *locus*. O *Microsatellite Toolkit* (Park, 2001), uma aplicação do *Excel*[®] (*Microsoft*), foi o *software* utilizado para a determinação deste parâmetro.

2.5.1.2. Diversidade alélica e riqueza alélica

A diversidade alélica (A) é o número total de alelos presentes numa amostra para um dado *locus*.

A riqueza alélica (R_s), é uma medida de diversidade alélica corrigida para diferenças existentes entre os tamanhos das amostras analisadas, ou seja, ajustada pelo tamanho da amostra de menor dimensão. Esta medida permite uniformizar as amostras em estudo de modo a torná-las comparáveis. Este parâmetro é traduzido pela seguinte equação:

$$R_S = \sum_{i=1}^n \left[1 - \frac{\binom{2N - K_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right],$$

onde K_i é o número de alelos do tipo i na amostra de $2N$ cromossomas e n é o número de indivíduos da amostra de menor tamanho (El Mousadik & Petit, 1996). Estes parâmetros foram determinados através do programa *FSTAT* versão 2.9.3.2 (Goudet, 1995).

2.5.1.3. Heterozigotia esperada e observada

Entende-se por heterozigotia esperada (H_e), a proporção esperada de genótipos heterozigóticos numa população de N indivíduos, baseada nas frequências alélicas num dado *locus*, assumindo o princípio de Hardy-Weinberg. De acordo com Nei (1987) este parâmetro é traduzido por:

$$H_e = \frac{2N(1 - \sum p_i^2)}{(2N - 1)},$$

onde p_i é a frequência do i -ésimo alelo e N o número de indivíduos da amostra. A heterozigotia observada (H_o) é a proporção de genótipos heterozigóticos numa amostra de N indivíduos. Estes parâmetros foram determinados com auxílio do programa *Arlequin* versão 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

2.5.1.4. Princípio de Hardy-Weinberg

De acordo com o modelo criado por Godfrey H. Hardy e Wilhelm Weinberg (1908), uma dada população está em equilíbrio genético se possuir um tamanho elevado, se for constituída por indivíduos diplóides e que se reproduzam sexualmente, se o acasalamento for aleatório (panmixia), se não ocorrerem mutações ou se as mesmas puderem ser ignoradas, se não existir migração (populações isoladas) e se a selecção natural não afectar as frequências alélicas (Hartl, 1988; Tamarin, 2001; De Meeûs, 2007; Hamilton, 2009). Portanto, se todos estes pressupostos se verificarem, as frequências alélicas e respectivos genótipos da população manter-se-ão inalteráveis durante sucessivas gerações, considerando-se a população como estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Este modelo fornece, aos geneticistas populacionais, uma base para a comparação de populações e para averiguar a ocorrência de processos evolutivos (Tamarin, 2001).

Os desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg podem dever-se a vários factores como selecção, acasalamento não-aleatório entre indivíduos que partilham o mesmo fenótipo, consanguinidade ou endogamia, presença de alelos nulos e subestruturação populacional (efeito de *Wahlund*) (Karlsson & Mork, 2005).

Para detectar desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg seguiu-se o procedimento descrito por Guo e Thompson (1992), usando-se um teste análogo ao teste exacto de Fisher para tabelas de contingência. Este parâmetro foi analisado com recurso ao programa *Genepop* versão 1.2 (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008). Para cada *locus* microssatélite testou-se a hipótese nula (H_0 = união aleatória de gâmetas) com duas hipóteses alternativas (H_1 = défice de heterozigóticos ou H_1 = excesso de heterozigóticos), sendo que o valor de P consiste na proporção de tabelas exploradas para as quais se obteve uma probabilidade inferior ou igual à tabela de contingência inicial (Excoffier & Lischer, 2010).

2.5.1.5. Endogamia

Entende-se por endogamia (*inbreeding*) o acasalamento entre indivíduos aparentados ou a união não aleatória de gâmetas o que, consequentemente, é responsável pelo aumento dos níveis de homozigotia numa dada população (Hartl, 1988; De Meeûs *et al.*, 2007).

O coeficiente de *inbreeding* (F_{IS}) é uma medida que traduz os níveis de heterozigotia/homozigotia numa dada população, correspondendo valores negativos a excesso de heterozigóticos e valores positivos a défice de heterozigóticos. Portanto, quando o acasalamento entre os indivíduos de uma população ocorre de modo aleatório ($F_{IS} = 0$; $H_e = H_o$), as frequências genóticas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (De Meeûs *et al.*, 2007). Este parâmetro pode ser traduzido por:

$$F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e},$$

onde H_e é a heterozigotia esperada e H_o é a heterozigotia observada na população. Este parâmetro foi obtido através do programa *FSTAT* versão 2.9.3.2 (Goudet, 1995), para cada *locus* microssatélite.

2.5.1.6. Desequilíbrio de *linkage*

Entende-se por desequilíbrio de *linkage* a associação não aleatória de alelos em *loci* diferentes, o que ocorre quando os genótipos para dois *loci* não são independentes um do outro. Este parâmetro reflecte a força da recombinação genética, bem como, factores demográficos como história populacional e endogamia (Kim *et al.*, 2007). Os mecanismos mais importantes que podem ser responsáveis pela ocorrência de desequilíbrio de *linkage* são a selecção natural epistática, ou seja, a interacção entre dois ou mais genes em que um vai interferir com o efeito fenotípico do outro de forma não aditiva, e a deriva genética (Hartl, 2000).

Este parâmetro foi analisado com recurso ao programa *Genepop* versão 1.2 (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008).

2.5.2. Alelos nulos

A ocorrência de alelos nulos, juntamente com a subdivisão populacional, é reconhecida como sendo o maior factor de depressão da heterozigotia observada em microssatélites (Callen *et al.*, 1993). Consequentemente, este acontecimento pode afectar as estimativas de parâmetros-chave como a endogamia ou medidas de diferenciação genética (Carlsson, 2008; Chybicki & Burczyk, 2009).

Com o objectivo de verificar a presença de alelos nulos e estimar a sua frequência dentro das populações e para os microssatélites em estudo, recorreu-se aos programas *Micro-Checker* versão 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004) e *FreeNA* (Chapuis & Estoup, 2007). O primeiro permite detectar erros de genotipagem devidos não só a alelos nulos como também à dominância de alelos curtos e *stuttering*. O segundo permite estimar as frequências dos alelos nulos e ajustar as frequências alélicas e genotípicas caso os mesmos estejam presentes (Oosterhout *et al.*, 2004). Com base nos resultados obtidos pelo *Micro-Checker*, obteve-se uma base de dados corrigida para alelos nulos através do *FreeNA*. A base de dados corrigida para alelos nulos foi utilizada subsequentemente para análises de diferenciação genética.

2.5.3. Estrutura populacional

A maioria das populações naturais está dividida em subpopulações de tamanho limitado, tendo a estrutura populacional uma enorme influência na distribuição da

informação genética (De Meeûs *et al.*, 2007). O índice de fixação (F_{ST}), parâmetro estatístico definido por Wright (1931), reflecte a endogamia resultante da subdivisão populacional em subpopulações de tamanho limitado. É, portanto, uma medida do efeito de *Wahlund* associada a uma medida de diferenciação genética entre subpopulações (De Meeûs *et al.*, 2007). O parâmetro F_{ST} pode ser definido como:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T},$$

onde H_S representa a heterozigotia esperada numa subpopulação com acasamentos ao acaso e H_T a heterozigotia esperada numa população total.

Este parâmetro pode variar entre $F_{ST} = 0$ quando a identidade genética entre os indivíduos é independente da subpopulação à qual pertencem (sem diferenciação genética) e $F_{ST} = 1$ quando todos os indivíduos da mesma subpopulação são idênticos geneticamente (elevada diferenciação genética entre subpopulações) (Roderick, 1996; De Meeûs *et al.*, 2007; Hamilton, 2009).

As estimativas de F_{ST} foram calculadas segundo Weir & Cockerham (1984) através do programa *FSTAT* versão 2.9.3.2 (Goudet, 1995). A significância dos valores de F_{ST} obtidos (*i.e.* valores significativamente diferentes de zero) foi determinada por testes de permutação disponíveis no mesmo *software* (Goudet, 1995).

A estrutura genética de uma população é influenciada não só pela sua história mas também pelas características próprias de cada espécie. Uma estrutura genética fraca indica coesão das espécies enquanto que uma estrutura genética forte está associada a uma fragmentação ou, em alguns casos, sugere a ocorrência de fenómenos de especiação (Salgueiro, 2007).

Com o objectivo de sustentar os resultados obtidos pela análise descrita anteriormente, bem como, de compreender os níveis de estruturação presentes entre as populações analisadas, recorreu-se a métodos Bayesianos. Estes métodos permitem inferir o nível de divisão dos indivíduos em subpopulações e à presença de subpopulações dentro de uma população (Pritchard *et al.*, 2000b; Corander *et al.*, 2003). Para análises Bayesianas de subestrutura populacional recorreu-se aos programas *BAPS* versão 5.4 (Corander & Martinen, 2006; Corander *et al.*, 2008) e *Structure* versão 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000a). No primeiro, a análise de *clusters* foi realizada para grupos de indivíduos. No programa *Structure* foi utilizado o modelo de mistura, com 100000

simulações para cada corrida, e frequências alélicas correlacionadas com valores de média, desvio padrão e λ definidos para 0.01, 0.05 e 1.0, respectivamente. Para ambas as análises, o número de *clusters* (K, *i.e.* grupos de populações) foi definido para 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 e, para cada K, a análise foi replicada 10 vezes.

O *software Genetix* versão 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004) foi utilizado para realizar uma Análise Factorial de Correspondência (AFC). Esta análise permite representar a distância genética entre indivíduos num espaço métrico bi ou tridimensional (Almeida, 2007).

2.5.4. Isolamento por distância

Tendo em conta que o conjunto de populações estudadas neste trabalho incluiu uma população de uma região insular, pretendeu-se verificar se a mesma estava isolada geograficamente das restantes. O isolamento por distância é um fenómeno que diminui as hipóteses de acasalamento ou fluxo genético à medida que a distância geográfica entre os indivíduos ou populações aumenta (Hamilton, 2009). Para verificar a ocorrência deste fenómeno realizaram-se testes de Mantel através do programa *Arlequin* versão 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

O teste de Mantel consiste em testar a significância da correlação entre duas ou mais matrizes (neste caso, de diferenciação genética e de distância geográfica entre populações) por um procedimento de permutação, permitindo obter a distribuição empírica nula do coeficiente de correlação tendo em conta as auto-correlações dos elementos da matriz (Excoffier & Lischer, 2010).

Tendo em conta que a população de Rio Campo é constituída por indivíduos de uma subespécie glossínica diferente dos indivíduos que constituem as populações da Guiné-Bissau, esta população não foi incluída neste teste.

2.5.5. Análise de *Bottleneck*

Para *loci* selectivamente neutros (*e.g.* microsatélites), o número e frequências alélicas em populações naturais são resultado de um equilíbrio entre mutações e deriva genética, designado por equilíbrio mutação-deriva (MDE) (Cornuet & Luikart, 1996). Quando ocorrem desvios significativos ao equilíbrio mutação-deriva que promovam uma redução no tamanho efectivo populacional (N_e), diz-se que a mesma sofreu um

efeito de gargalo de garrafa (*bottleneck*) (Luikart *et al.*, 1998). A detecção destes eventos é importante uma vez que a sua ocorrência pode ser responsável por alguns tipos de especiação, pelo aumento da taxa de endogamia, perda de variação genética, fixação de alelos deletérios, redução do potencial adaptativo e, consequentemente, aumento do risco de extinção das populações (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart & Cornuet, 1998; Luikart *et al.*, 1998; Piry *et al.*, 1999).

Com o objectivo de verificar se ocorreu redução no N_e em alguma das populações estudadas recorreu-se ao programa *Bottleneck* versão 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Este *software* tem como princípio a comparação da heterozigotia esperada assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) com a heterozigotia esperada assumindo MDE (H_{eq}). Quando ocorre um *bottleneck*, há uma súbita redução do número de alelos e, consequentemente, da heterozigotia esperada assumindo MDE (H_{eq}), uma vez que esta é calculada a partir do número de alelos e tamanho da amostra. Portanto, este fenómeno vai gerar um aparente excesso de heterozigotia ($H_e > H_{eq}$). O motivo para esta ocorrência é o facto dos alelos raros serem perdidos mais rapidamente durante um *bottleneck* e por estes contribuírem pouco para a heterozigotia (Cornuet & Luikart, 1996).

Neste estudo, as estimativas de heterozigotia esperada em MDE (H_{eq}) foram calculadas com base em dois modelos de mutação: o SMM e um modelo intermédio designado por modelo de duas-fases (*two-phased model* – TPM) que incluiu uma proporção de mutações maiores que uma repetição de 15%. Estes são considerados os modelos mais adequados para dados microssatélites (Luikart & Cornuet, 1998). Foram utilizados testes de Wilcoxon disponíveis no *software bottleneck* para determinar se em cada amostra havia um número significativo de *loci* em que $H_e > H_{eq}$ (indicador de *bottleneck*) ou $H_e < H_{eq}$ (indicador de expansão populacional) (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart & Cornuet, 1998; Piry *et al.*, 1999).

2.5.6. Nível de significância dos testes estatísticos

Os parâmetros determinados na análise estatística foram testados a um nível nominal de significância ($\alpha=0,05$) para a rejeição da hipótese nula (H_0) e, para testes múltiplos, este valor foi corrigido de acordo com o método sequencial de Bonferroni (α') (Holm, 1979) de modo a evitarem-se erros do tipo I (falsa rejeição de H_0).

3. RESULTADOS

Neste estudo foram analisadas, no total, 261 fêmeas da subespécie *Glossina palpalis gambiensis* provenientes de cinco regiões da Guiné-Bissau: 97 exemplares da região de Biombo, 19 da região de Bijagós, 33 da região de Bolama, 31 da região de Gabú e 81 da região de Tombali.

3.1. Quantificação e pureza do DNA genómico

A verificação da pureza e da concentração do DNA genómico extraído foi realizada com recurso a métodos espectrofotométricos, estando os respectivos valores discriminados na Tabela 6.

Tabela 6. Pureza e concentração média do DNA extraído das amostras provenientes das diferentes regiões da Guiné-Bissau em estudo.

	<i>N</i>	Amostras com $Abs_{260}/Abs_{280} > 2,0$	$[DNA]_{média}$ (ng/ μ l)
Biombo	97	55 (56,7%)	88,52
Bijagós	19	10 (52,6%)	80,48
Bolama	33	27 (81,8%)	94,96
Gabú	31	18 (58,1%)	69,03
Tombali	81	70 (86,4%)	96,04
Total	261	180 (68,9%)	85,81

Legenda: *N* – número de indivíduos presentes em cada população.

De um total de 261 amostras extraídas, 180 (68,9%) apresentaram valores de Abs_{260}/Abs_{280} superiores a 2,0 e a concentração média de DNA genómico obtida para as amostras foi de 85,81 ng/ μ l. Apenas uma amostra, proveniente da região de Gabú, apresentou valor Abs_{260}/Abs_{280} inferior a 1,8 (*i.e.* 1,67), embora se tenha obtido uma boa concentração de DNA genómico (*i.e.* \cong 42ng/ μ l).

O quociente Abs_{260}/Abs_{280} representa uma estimativa da pureza do DNA, considerando-se que o mesmo está puro quando este valor está entre 1,8 e 2,0. No entanto, condições presentes na amostra podem interferir com este resultado como é o caso da presença de proteínas, RNA e pH da solução. A presença de proteínas em solução é responsável por valores de quociente Abs_{260}/Abs_{280} inferiores a 1,8 enquanto a presença de RNA é responsável por valores superiores a 2,0 (Ahn *et al.*, 1996; Sauer *et al.*, 1998). Portanto, possíveis razões para a quantidade das amostras cujos valores se

encontram acima do limiar de pureza são a presença de RNA, pois as RNases são inibidas pela proteinase K (utilizada no processo de extração), e a alcalinidade das soluções promovida pelo tampão de eluição utilizado que possui um pH igual a 9.0 (www.qiagen.com/HB/DNeasy96Tissue, 26 de Julho de 2011).

A baixa concentração média de DNA genómico obtida, quando em comparação com outros trabalhos (*e.g.* Furtado, 2006b), pode dever-se não só à metodologia de extração adoptada como também ao volume de eluição utilizado, uma vez que quanto maior for este volume menor será a concentração obtida, embora o rendimento global de DNA seja superior.

No PCR para a amplificação de gene conservado da α -tubulina (Hao *et al.*, 2003), realizado para as amostras de DNA com valores de concentração baixos e quocientes Abs_{260}/Abs_{280} acima do limiar de pureza (*i.e.* $>2,0$), foi possível obter produtos amplificados na maioria das amostras (excepto três). As diferentes intensidades verificadas entre os produtos amplificados podem traduzir diferenças existentes entre a qualidade e quantidade do DNA extraído ou variação experimental entre amostras (*e.g.* pipetagens) (Fig.11). O peso molecular dos fragmentos de DNA amplificados variou entre 300 e 400pb.

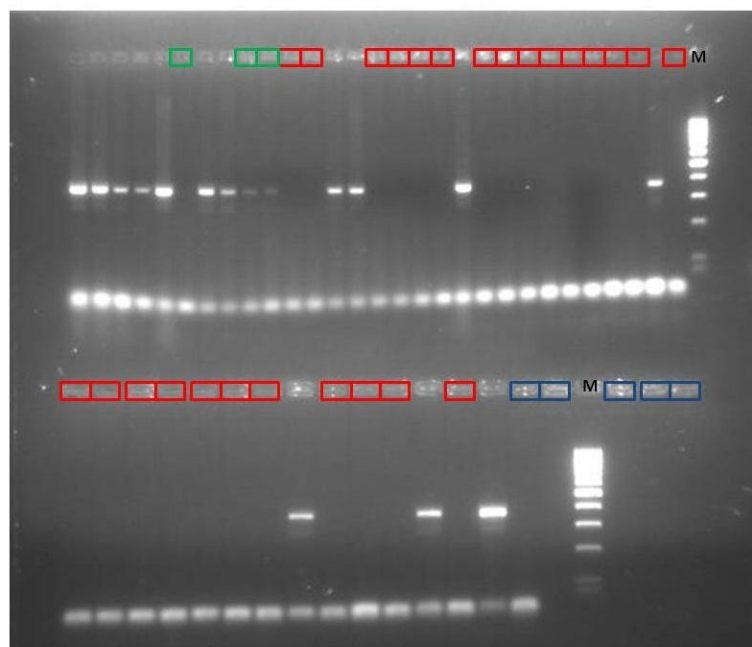


Figura 11. Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose (2%) corados com brometo de etídio. As caixas vermelhas correspondem aos brancos, as verdes às amostras de DNA cujo procedimento de extração foi repetido posteriormente, as azuis aos poços sem adição de qualquer solução e os poços não assinalados dizem respeito a amostras de DNA extraído de várias glossinas.

Estes resultados indicam que os processos de extracção e amplificação foram executados com sucesso e que, apesar de alguns resultados obtidos por espectrofotometria (Nanodrop® 1000, ThermoScientific) não serem satisfatórios, o DNA extraído estava em condições de ser utilizado na genotipagem de microssatélites.

3.2. Análise genética dos dados obtidos para os *loci* microssatélite

Devido à ocorrência de *stuttering* verificada para o *locus* *Pgp22* e, consequentemente, à dificuldade em definir o tamanho dos alelos amplificados, os dados obtidos para este *locus* não foram considerados nesta análise.

3.2.1. Diversidade genética

As frequências alélicas obtidas para cada *locus* e população estudada encontram-se sob a forma de gráficos de barras em anexo na Figura A. As estimativas de riqueza alélica, diversidade alélica, heterozigotia esperada e observada e o coeficiente de *inbreeding* encontram-se descritas na Tabela 7.

Uma vez que o número de alelos numa dada amostra é dependente do tamanho da mesma, a análise da riqueza alélica é a mais adequada para comparar amostras de tamanhos diferentes. Assim, após a correcção do número de alelos em relação à amostra com menor número de indivíduos (15 indivíduos diplóides), verificou-se que os valores de diversidade alélica são comparáveis entre as diferentes amostras estudadas, tendo Rio Campo apresentado o maior valor de riqueza alélica média por *locus* (8,8) e Bijagós o menor valor (7,0). Analisando os 11 *loci*, verificou-se que o *locus* *Pgp01* apresentava maior riqueza alélica (15,2) e o *locus* *Gms02* menor valor de riqueza alélica (2,3).

De um total de 66 testes efectuados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, verificou-se um défice de heterozigóticos significativo a um nível de significância nominal ($\alpha < 0,05$) em 35 destes. Após o ajuste do nível de significância pelo método sequencial de Bonferroni, 18 testes permaneceram significativos (27,2%): quatro *loci* na amostra de Biombo, três *loci* na amostra de Bijagós, dois *loci* na amostra de Bolama, um *locus* na amostra de Gabú, três *loci* na amostra de Tombali e, na amostra de Rio Campo, cinco *loci*.

Tabela 7. Riqueza alélica, diversidade alélica, heterozigotia esperada e observada e estimativa do coeficiente de *inbreeding* para cada *locus* microssatélite e para cada população em estudo.

<i>Locus</i>		Biombo (N=97)	Bijagós (N=19)	Bolama (N=33)	Gabú (N=31)	Tombali (N=81)	Rio Campo (N=41)	Total Populações
<i>Pgp01</i>	R_s	14.7	13.0	13.8	12.6	14.7	9.1	15.2
	A	22.0	13.0	17.0	16.0	22.0	13.0	17.0
	H_e/H_o	0.938/ 0.844	0.929/1.000	0.930/ 0.733	0.919/0.767	0.939/ 0.743	0.813/ 0.634	0.911/ 0.787
	F_{IS}	0.101	-0.080	0.215	0.168	0.209	0.222	0.153
<i>Pgp08</i>	R_s	8.5	4.8	7.3	6.6	7.4	6.0	8.9
	A	12.0	5.0	9.0	7.0	11.0	7.0	9.0
	H_e/H_o	0.841/ 0.615	0.733/ 0.474	0.774/ 0.576	0.802/0.600	0.811/ 0.595	0.764/ 0.575	0.787/ 0.572
	F_{IS}	0.270	0.360	0.259	0.255	0.268	0.250	0.269
<i>Pgp11</i>	R_s	9.1	7.5	8.4	8.8	8.5	8.4	9.7
	A	15.0	8.0	10.0	11.0	12.0	10.0	11.0
	H_e/H_o	0.863/0.794	0.846/0.789	0.868/0.848	0.851/ 0.710	0.855/0.864	0.818/0.789	0.850/ 0.799
	F_{IS}	0.081	0.069	0.022	0.169	-0.011	0.035	0.051
<i>Pgp13</i>	R_s	9.4	10.9	8.3	8.5	8.4	15.0	11.0
	A	16.0	12.0	12.0	11.0	11.0	24.0	14.0
	H_e/H_o	0.749/0.760	0.849/0.789	0.730/0.667	0.666/0.710	0.807/0.802	0.916/0.829	0.786/0.760
	F_{IS}	-0.015	0.072	0.088	-0.066	0.005	0.096	0.017
<i>Pgp17</i>	R_s	15.6	14.7	12.8	13.8	12.6	12.6	14.1
	A	19.0	16.0	15.0	17.0	20.0	15.0	17.0
	H_e/H_o	0.910/0.845	0.944/ 0.684	0.928/0.909	0.927/0.935	0.917/0.877	0.915/ 0.364	0.924/ 0.769
	F_{IS}	0.072	0.281	0.020	-0.009	0.045	0.606	0.114
<i>Pgp28</i>	R_s	3.1	1.8	1.9	1.5	3.0	5.6	3.5
	A	7.0	2.0	3.0	2.0	5.0	8.0	4.5
	H_e/H_o	0.175/ 0.165	0.053/0.053	0.060/0.061	0.032/0.032	0.168/0.165	0.572/0.439	0.177/ 0.152
	F_{IS}	0.059	0.000	-0.008	0.000	0.021	0.235	0.133
<i>Pgp35</i>	R_s	7.6	7.3	7.9	9.1	7.1	12.1	9.1
	A	13.0	8.0	12.0	12.0	14.0	18.0	12.8
	H_e/H_o	0.722/0.639	0.643/0.056	0.739/0.727	0.838/0.742	0.653/0.617	0.893/ 0.725	0.748/ 0.663
	F_{IS}	0.115	0.186	0.016	0.117	0.055	0.190	0.105
<i>Gp133</i>	R_s	6.2	5.7	6.9	5.9	5.9	7.0	6.3
	A	10.0	6.0	9.0	7.0	9.0	9.0	8.3
	H_e/H_o	0.751/ 0.742	0.671/0.895	0.764/0.818	0.732/0.833	0.724/0.778	0.759/0.610	0.734/ 0.779
	F_{IS}	0.012	-0.345	-0.072	-0.141	-0.075	0.199	-0.025
<i>Gmm08</i>	R_s	6.1	7.3	4.8	6.7	6.7	1.5	8.2
	A	8.0	8.0	6.0	8.0	13.0	20.0	10.5
	H_e/H_o	0.687/0.711	0.751/ 0.526	0.415/0.303	0.600/0.567	0.593/ 0.513	0.939/ 0.784	0.664/ 0.567
	F_{IS}	-0.036	0.305	0.274	0.056	0.136	0.167	0.083
<i>Gms02</i>	R_s	2.2	1.0	2.0	2.8	2.2	2.8	2.3
	A	3.0	1.0	2.0	3.0	3.0	4.0	2.7
	H_e/H_o	0.262/0.200	#	0.189/0.207	0.275/0.241	0.261/0.228	0.417/0.300	0.233/ 0.196
	F_{IS}	0.236	#	-0.098	0.125	0.128	0.283	0.188
<i>Gms29</i>	R_s	3.1	2.6	3.2	2.8	3.1	3.6	3.2
	A	6.0	3.0	4.0	4.0	5.0	4.0	4.3
	H_e/H_o	0.202/0.165	0.104/0.105	0.225/0.212	0.154/0.161	0.232/0.203	0.596/0.475	0.252/ 0.220
	F_{IS}	0.183	-0.014	0.059	-0.045	0.126	0.205	0.152
Total <i>loci</i>	R_s	7.8	7.0	7.0	7.2	7.3	8.8	8.3
	A	6.6	7.5	9.0	5.5	11.4	12.0	10.1
	H_e/H_o	0.646/ 0.589	0.652/ 0.584	0.602/ 0.551	0.618/ 0.573	0.633/ 0.580	0.764/ 0.593	0.644/ 0.570
	F_{IS}	0.088	0.107	0.086	0.075	0.083	0.226	0.107

Legenda: R_s – Riqueza alélica; A – Diversidade alélica; H_e – Heterozigotia esperada; H_o – Heterozigotia observada; F_{IS} – Coeficiente de *Inbreeding*; # - *Locus* monomórfico. Os valores a **bold** representam testes de Hardy-Weinberg significativos após o ajuste do nível de significância para testes múltiplos, pelo método sequencial de Bonferroni ($\alpha' < 0,004$ para 11 testes e $\alpha' < 0,008$ para seis testes).

A amostra de Gabú foi a que apresentou menor proporção de *loci* com desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (9,1%), tendo a amostra de Rio Campo apresentado a maior proporção (45,5%). Os valores obtidos para o coeficiente de *inbreeding* estão consistentes com os resultados anteriores, tendo-se obtido valores positivos de F_{IS} para todos os casos em que se detectaram défices de heterozigóticos. Embora se verifiquem valores de F_{IS} inferiores a zero, não foi detectado nenhum caso com excesso de heterozigóticos.

Com o objectivo de verificar se os défices de heterozigóticos estão ou não relacionados com fenómenos como a subdivisão populacional, foram realizados testes de desequilíbrio de *linkage* para cada par de *loci* em cada uma das populações em estudo. Para um total de 330 testes realizados (55 associações por cada população), 20 (6%) foram significativos a um nível de significância nominal ($\alpha < 0,05$), tendo seis destes testes envolvido o *locus* *Pgp08* (30%), que também demonstrou défices de heterozigóticos significativos e presença de alelos nulos. No entanto, após o ajuste do nível de significância para testes múltiplos ($\alpha' < 0,0009$), apenas três testes permaneceram significativos (0,9%): par de *loci* *Pgp11/Gms02* na amostra de Biombo e pares de *loci* *Pgp01/Gp133* e *Gms02/Gms29* na amostra de Rio Campo.

3.2.2. Alelos nulos

De modo a verificar se os défices de heterozigóticos eram resultado da presença de alelos nulos ou de outro fenómeno, os dados obtidos foram analisados no programa *Micro-Checker* versão 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004). Num total de 65 testes, 22 apresentavam défice de heterozigóticos pela presença de alelos nulos. Em nenhum caso foi detectada a dominância de alelos curtos ou *stuttering* como possíveis causas para este défice. Dos testes nos quais a presença de alelos nulos foi detectada, cinco (22,7%) correspondem ao *locus* *Pgp01* e seis (27,3%) ao *locus* *Pgp08*. Dos 11 testes realizados para a população de Rio Campo, a presença de alelos nulos foi detectada em sete destes (31,8%).

As frequências estimadas de alelos nulos foram obtidas com recurso ao programa *FreeNA* e encontram-se representadas graficamente na Figura 12.

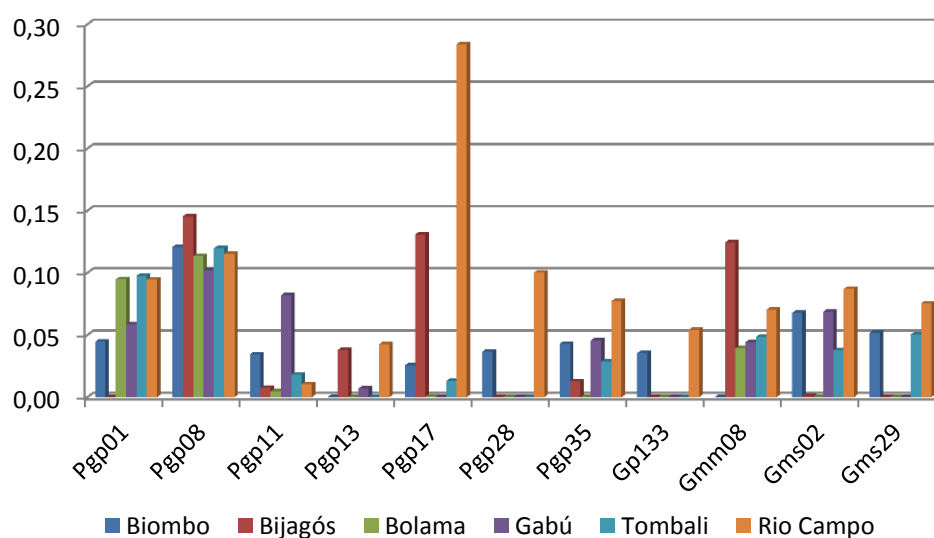


Figura 12. Frequências estimadas de alelos nulos para cada *locus* e população. Eixo dos xx: *loci* analisados; eixo dos yy: frequências de alelos nulos em percentagem. De acordo com Chapuis & Estoup (2007) $0,05 \leq r < 0,20$ corresponde a frequências moderadas e $r \geq 0,20$ corresponde a frequências elevadas.

Como se pode verificar, estes resultados estão de acordo com os obtidos através do *Micro-Checker*, com frequências de alelos nulos moderadas para o *locus* *Pgp01* em quatro das seis populações em estudo e para o *locus* *Pgp08* em todas as populações. O único caso para o qual a frequência de alelos nulos foi elevada verificou-se na população de Rio Campo para o *locus* *Pgp17*. Coincidentemente, este foi o caso para o qual se obteve o maior valor de F_{IS} (0,606) (Tab.7), o que pode indicar que a maior causa para o défice de heterozigóticos detectado, neste caso específico, tenha sido a ocorrência de alelos nulos.

3.2.3. Estruturação populacional

Com o objectivo de avaliar o grau de estruturação genética existente entre as populações em estudo, estimativas de F_{ST} foram calculadas para cada par de população e total de *loci*, estando descritas na Tabela 8.

O valor global de F_{ST} obtido foi de 0,060 com um valor de P associado de 0,04. Contudo, quando se realizou esta análise apenas com os dados das amostras provenientes da Guiné-Bissau, obteve-se um valor global de F_{ST} de 0,006 com um valor de P associado de 0,002. Dos testes realizados, 10 foram significativos a um nível de

significância nominal e, após correcção do nível de significância para testes múltiplos, apenas sete permaneceram significativos.

Tabela 8. Índices de fixação F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) obtidos entre pares de populações e para o total de *loci* microssatélite analisados.

	Biombo	Bijagós	Bolama	Gabú	Tombali
Bijagós	0,004				
Bolama	<u>0,013</u>	<u>0,021</u>			
Gabú	0,004	<u>0,015</u>	0,004		
Tombali	<u>0,004</u>	<u>0,008</u>	0,007	0,006	
Rio Campo	<u>0,150</u>	<u>0,170</u>	<u>0,172</u>	<u>0,158</u>	<u>0,162</u>

Legenda: Os valores a sublinhado correspondem aos testes significativos para um nível de significância nominal ($\alpha < 0,05$); a **bold** encontram-se os testes significativos após o ajuste do nível de significância para testes múltiplos, pelo método sequencial de Bonferroni ($\alpha' < 0,003$).

De um modo geral, os níveis de diferenciação genética entre as populações da Guiné-Bissau foram baixos, embora significativos a um nível de significância nominal em cinco casos. Após o ajuste do nível de significância para testes múltiplos, apenas dois casos se mantiveram significativos entre as populações da Guiné-Bissau: Bolama/Biombo ($P = 0,002$) e Bolama/Bijagós ($P < 0,001$). Verificou-se que entre todas as populações das duas subespécies, *G. p. gambiensis* da Guiné-Bissau e *G. p. palpalis* de Rio Campo, os valores de diferenciação genética foram significativamente mais elevados (valor médio de $F_{ST} = 0,162$; $P < 0,001$).

Os resultados obtidos nas análises de subestruturação populacional encontram-se representados nas Figuras 13 e 14.

De acordo com a análise realizada através dos programas *BAPS* (Fig.13) e *Structure* (Fig.14), para valores de K definidos entre 2 e 8, verificou-se que apesar dos valores de F_{ST} obtidos entre algumas populações provenientes da Guiné-Bissau serem significativos, estas não estão agrupadas em subpopulações distintas, não havendo subestruturação populacional, *i.e.*, as populações são geneticamente semelhantes. No entanto, a diferenciação genética entre as populações da Guiné-Bissau e Rio Campo é sustentada pelos resultados obtidos nestes dois testes. Portanto, para um total de seis populações analisadas obtiveram-se apenas dois *clusters* ($K=2$), um contendo as

populações de Biombo, Bijagós, Bolama, Gabú e Tombali e o outro contendo a população de Rio Campo, ou seja, dois *clusters* coincidentes com duas subespécies.

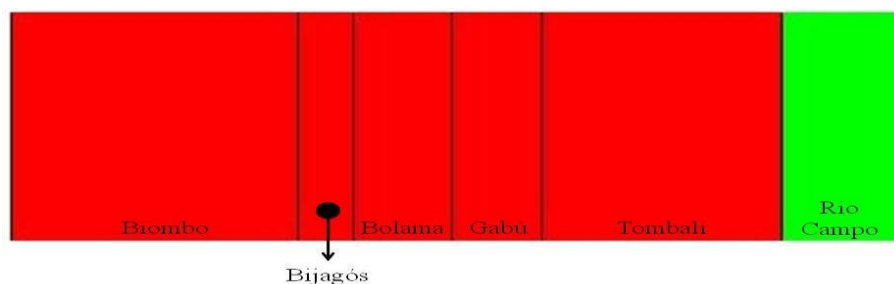


Figura 13. Análise Bayesiana obtida pelo programa *BAPS*.

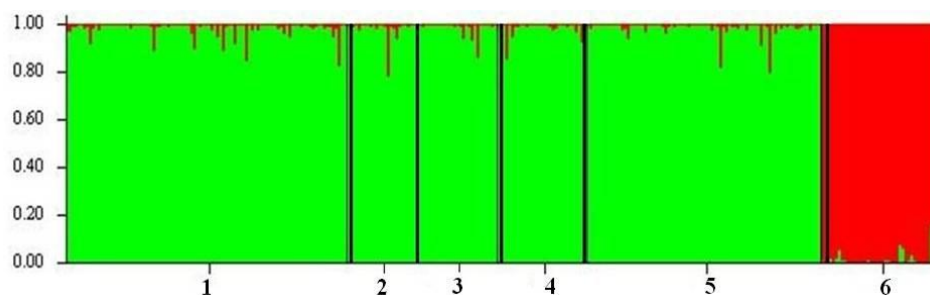


Figura 14. Análise Bayesiana obtida pelo programa *Structure*. 1) Biombo; 2) Bijagós; 3) Bolama; 4) Gabú; 5) Tombali; 6) Rio Campo.

A AFC (Fig.15), levada a cabo no programa *Genetix*, sustenta os resultados obtidos nas análises anteriores com a diferenciação genética entre indivíduos de Rio Campo e das restantes populações a explicar 76,78% da diferenciação total entre amostras.

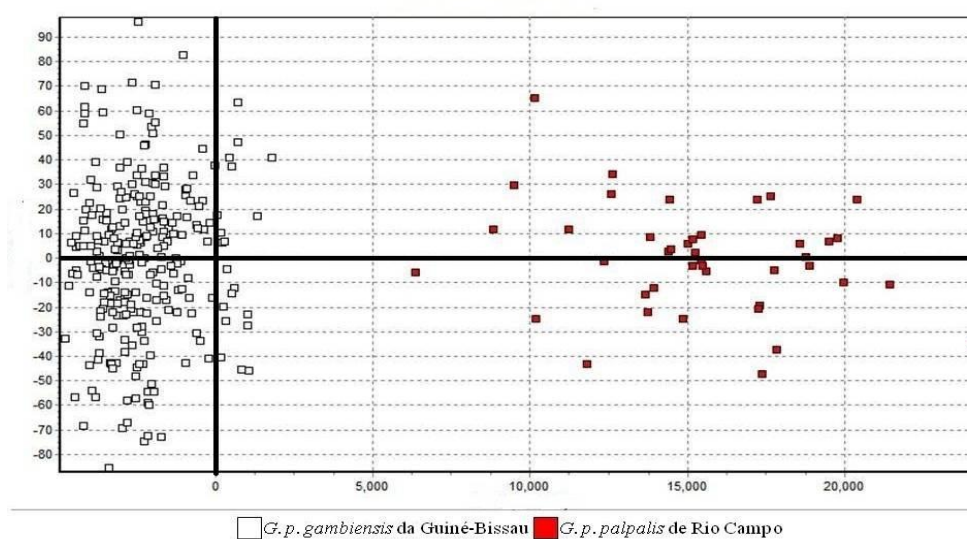


Figura 15. Análise Factorial de Correspondência com base nas diferenças alélicas entre os *loci* e populações em estudo. Eixo horizontal: FC1 (76,78%); eixo vertical: FC2 (7,27%).

Uma vez que a presença de alelos nulos influencia as estimativas de diferenciação genética, as análises descritas anteriormente foram repetidas com a base de dados corrigida para alelos nulos, estando os resultados obtidos representados a seguir.

Tabela 9. Índices de fixação F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) obtidos com a base de dados corrigida para alelos nulos entre pares de populações e para o total de *loci* microsatélite analisados.

	Biombo	Bijagós	Bolama	Gabú	Tombali
Bijagós	<u>0,009</u>				
Bolama	<u>0,011</u>	<u>0,021</u>			
Gabú	<u>0,004</u>	<u>0,018</u>	<u>0,003</u>		
Tombali	<u>0,004</u>	<u>0,009</u>	<u>0,006</u>	<u>0,007</u>	
Rio Campo	<u>0,140</u>	<u>0,156</u>	<u>0,163</u>	<u>0,148</u>	<u>0,151</u>

Legenda: Os valores a sublinhado correspondem aos testes significativos para um nível de significância nominal ($\alpha < 0,05$); a **bold** encontram-se os testes significativos após o ajuste do nível de significância para testes múltiplos, pelo método sequencial de Bonferroni ($\alpha' < 0,003$).

O valor global de F_{ST} obtido foi de 0,056 com um valor de P associado de 0,04. Para a análise realizada sem os dados da amostra proveniente de Rio Campo, obteve-se um valor global de F_{ST} de 0,007 com valor de P associado de 0,004. Dos testes realizados, todos foram significativos a um nível de significância nominal e, após correção do nível de significância para testes múltiplos, 11 permaneceram significativos. Com base nos resultados descritos na Tabela 9, pôde verificar-se que a presença de alelos nulos teve pouco efeito nas estimativas de F_{ST} entre amostras da Guiné-Bissau. Os valores de F_{ST} obtidos para a base corrigida foram inferiores aos da base original em três comparações, superiores em quatro e idênticos em três. No entanto, após o ajuste do nível de significância para testes múltiplos, verificou-se um aumento no número de casos com valores de F_{ST} significativos: Biombo/Bolama ($P < 0,001$), Biombo/Tombali ($P < 0,001$) e entre a população de Bijagós e todas as populações continentais da Guiné-Bissau ($P \leq 0,001$). Já as comparações entre *G. p. gambiensis* e *G. p. palpalis* foram consistentemente inferiores para a base corrigida, embora se tenham mantido altamente significativas em todos os casos ($P < 0,001$). De um modo geral, o grau de diferenciação genética manteve-se baixo entre as populações da Guiné-Bissau e mais elevado entre estas populações e a população de Rio Campo.

Após a análise dos dados corrigidos para alelos nulos, não se verificou qualquer alteração nos resultados obtidos para os testes de subestruturação populacional (Fig.16 e 17), mantendo-se os dois *clusters* (K=2) anteriormente definidos, um contendo as populações de *G. p. gambiensis* (Guiné-Bissau) e outro contendo a população de *G. p. palpalis* (Rio Campo).

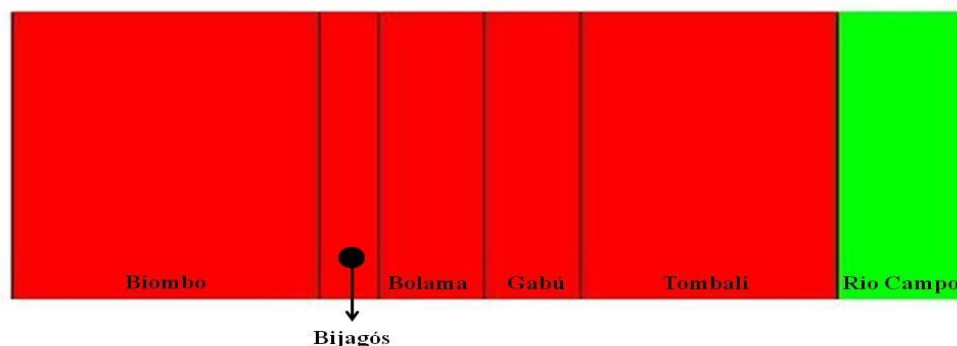


Figura 16. Análise Bayesiana obtida pelo programa *BAPS* com a base de dados corrigida para alelos nulos.

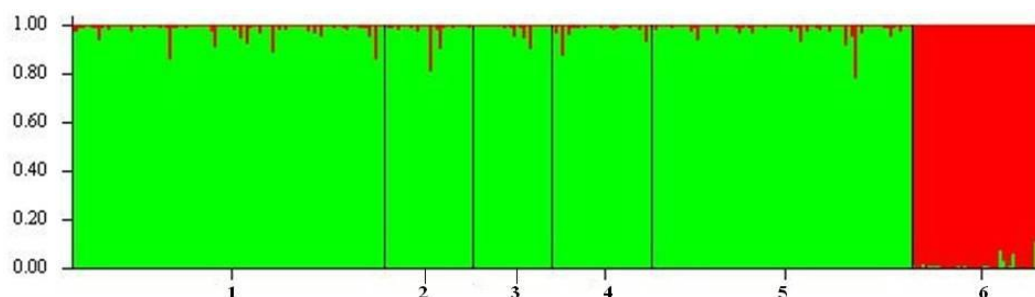


Figura 17. Análise Bayesiana obtida pelo programa *Structure* com a base de dados corrigida para alelos nulos. 1) Biombo; 2) Bijagós; 3) Bolama; 4) Gabú; 5) Tombali; 6) Rio Campo.

A AFC realizada com a base de dados corrigida para alelos nulos (Fig.18), também não apresentou grandes diferenças relativamente à análise feita com a base de dados original. Verificou-se uma diferenciação genética entre Rio Campo e as restantes populações a explicar 75,71% da diferenciação entre amostras.

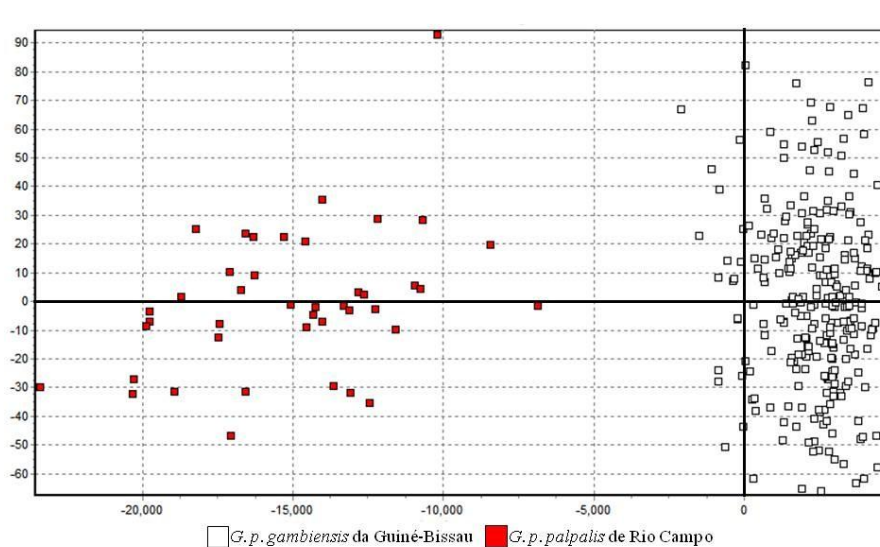


Figura 18. Análise Factorial de Correspondência com base nas diferenças alélicas entre os *loci* e populações em estudo, obtida com a base de dados corrigida para alelos nulos. Eixo horizontal: FC1 (75,71%); eixo vertical: FC2 (7,56%).

3.2.4. Isolamento por distância

Para verificar se a população de Bijagós estava isolada geograficamente das populações continentais da Guiné-Bissau avaliou-se a existência de uma correlação entre a distância geográfica e a diferenciação genética com recurso ao teste de Mantel. O coeficiente de correlação (r) obtido foi de -0,25 com uma probabilidade associada (valor de P) de 0,62. O mesmo teste foi realizado com a base de dados corrigida para alelos nulos, tendo-se obtido um coeficiente de correlação (r) de -0,18 e um valor de $P=0,54$. De acordo com estes resultados, não há uma correlação significativa entre a distância geográfica e o perfil genético existente entre as diferentes populações, não se verificando portanto isolamento por distância (ver distância entre as diferentes regiões em anexo – Tabela A).

3.2.5. Análise de *Bottleneck*

Na tentativa de relacionar os resultados obtidos com factores históricos e/ou demográficos, procedeu-se à análise de efeito de gargalo através de testes de heterozigotia, cujos resultados estão descritos na Tabela 10.

Verificou-se um défice de heterozigotia generalizado ($H_e < H_{eq}$) e significativo a um nível de significância nominal ($\alpha < 0,05$), com excepção da amostra de Rio Campo para TPM. Após o ajuste do nível de significância pelo método sequencial de

Bonferroni ($\alpha' < 0,003$), apenas as amostras de Biombo, Gabú e Tombali mantiveram défices de heterozigotia significativos e de acordo com o modelo de mutação SMM. Estes resultados sugerem que estas populações terão experienciado uma expansão populacional recente.

Tabela 10. Probabilidades associadas aos défices ou excessos de heterozigotia (valor de P), para cada população em estudo, de acordo com os modelos TPM e SMM.

		<i>P-value</i> ($H_e < H_{eq}$)	<i>P-value</i> ($H_e > H_{eq}$)	<i>P-value</i> Global
Biombo	TPM	<u>0,02686</u>	0,98950	0,05371
	SMM	0,00073	0,99951	0,00146
Bijagós	TPM	<u>0,04199</u>	0,98389	0,08398
	SMM	<u>0,04199</u>	0,98389	0,08398
Bolama	TPM	<u>0,03369</u>	0,97314	0,06738
	SMM	<u>0,00610</u>	0,99536	<u>0,01221</u>
Gabú	TPM	<u>0,03369</u>	0,97314	0,06738
	SMM	0,00244	0,99829	<u>0,00488</u>
Tombali	TPM	<u>0,02686</u>	0,98950	0,05371
	SMM	0,00049	0,99976	0,00098
Rio Campo	TPM	0,05078	0,95850	0,10156
	SMM	<u>0,00610</u>	0,99536	<u>0,01221</u>

Legenda: $H_e < H_{eq}$: teste de Wilcoxon para défice de heterozigotia, $H_e > H_{eq}$: teste de Wilcoxon para excesso de heterozigotia, P -value Global: Teste de Wilcoxon *two-sided* ($H_e \neq H_{eq}$). Os valores a sublinhado correspondem aos testes significativos para um nível de significância nominal ($\alpha < 0,05$), a **bold** encontram-se os testes significativos após o ajuste do nível de significância para testes múltiplos, pelo método sequencial de Bonferroni ($\alpha' < 0,003$).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1. Diversidade genética

Tal como já foi demonstrado em outros trabalhos (Luna *et al.*, 2001; Camara *et al.*, 2006), os microssatélites utilizados são bastante úteis em estudos de genética populacional de *G. palpalis gambiensis*, tendo-se detectado um nível considerável de diversidade genética para o grupo de 11 *loci* microssatélites analisados, com uma riqueza alélica média de 8,3 e uma heterozigotia média esperada de 0,644. Estimativas comparáveis para microssatélites foram obtidas em estudos de populações de *G. p. gambiensis* do Senegal ($H_e = 0,509$) e Burkina Faso ($H_e = 0,540$ e $H_e = 0,625$) (Solano *et al.*, 1999; Bouyer *et al.*, 2007); *G. morsitans centralis* do Botswana, Namíbia e Zâmbia ($H_e = 0,661$) (Krafsur *et al.*, 2001); e *G. m. submorsitans* de Burkina Faso ($H_e = 0,690$) (Krafsur & Endsley, 2002).

Comparando as subespécies, a amostra de *G. p. palpalis* de Rio Campo apresentou uma maior diversidade genética quando comparada com as amostras de *G. p. gambiensis* da Guiné-Bissau. As estimativas de H_e (0,764) e R_s (8,8) estão de acordo com estudos anteriores realizados em *G. morsitans morsitans* e *G. fuscipes fuscipes* da África Oriental e *G. p. palpalis* da RDC (Krafsur & Endsley, 2002; Krafsur *et al.*, 2008; Melachio *et al.*, 2011).

Foi detectado um número considerável de testes com desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. A maioria dos casos em que se verificaram estes desvios corresponde aos *loci* *Pgp01* (quatro amostras em seis) e *Pgp08* (cinco amostras em seis), tendo as amostras de Rio Campo apresentado mais défices de heterozigóticos (cinco *loci* em 11), relativamente às restantes. Valores de F_{IS} positivos estão associados a grande parte destes casos, o que corrobora a ocorrência de défice de heterozigóticos. Estudos anteriores realizados em *G. p. palpalis* da Costa do Marfim (Ravel *et al.*, 2007) e *G. p. gambiensis* da Guiné Conacri e do Senegal (Solano *et al.*, 2009; Solano *et al.*, 2010), obtiveram resultados similares para o *locus* *Pgp01*.

Na maioria dos casos, a presença de alelos nulos foi detectada como possível causa para os défices de heterozigóticos, tendo-se obtido frequências estimadas para alelos nulos moderadas, na maioria das amostras, para os *loci* *Pgp01* e *Pgp08*. Frequências de alelos nulos moderadas a elevadas foram estimadas para populações de *G. p. gambiensis* de Burkina Faso (Luna *et al.*, 2001), com uma frequência para o *locus*

Pgp13 de 37%, ao contrário do que se verificou neste estudo cuja frequência para este *locus* não ultrapassou os 4%.

O reduzido número de testes de desequilíbrio de *linkage* significativos (3 em 330) não é consistente com a hipótese de efeito de *Wahlund*, *i.e.*, não se verifica uma amostragem de *pools* genéticos distintos dentro de cada amostra estudada. Provavelmente, os desequilíbrios de *linkage* verificados neste estudo, e que envolveram o *locus Pgp08*, podem dever-se a fenómenos *locus*-específicos como a presença de alelos nulos.

Os desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg verificados, aliados à suspeita de ocorrência de alelos nulos pela análise do *Micro-Checker*, justificaram a análise de uma base corrigida para estudos de diferenciação genética.

4.2. Diferenciação genética e subestruturação populacional

Os níveis de diferenciação genética detectados entre amostras de *G. p. gambiensis* na Guiné-Bissau, medido através de estimativas de F_{ST} , foram de modo geral bastante baixos. A reduzida diferenciação genética entre as amostras guineenses foi confirmada pelas análises Bayesianas de *clustering*. Ambos os métodos (*BAPS* e *Structure*) agruparam todos os indivíduos de *G. p. gambiensis* analisados num único *cluster*, independentemente da sua origem geográfica, o que revela ausência de uma subestruturação populacional evidente. De igual modo, os dados obtidos para a correlação entre distâncias genéticas e geográficas não corroboram a ocorrência de isolamento por distância.

Na comparação entre as amostras das duas subespécies de glossinas estudadas, verificou-se uma elevada e significativa diferenciação genética. Resultados comparáveis foram descritos para populações de *G. morsitans s.l.* de várias regiões de África (Krafsur & Endsley, 2002). Os resultados da análise Bayesiana de estrutura populacional sustentam estas conclusões, verificando-se que a população de Rio Campo pertence a um *cluster* diferente daquele ao qual pertencem as populações da Guiné-Bissau. O mesmo tipo de subdivisão é evidenciado na representação gráfica da AFC, com os indivíduos de *G. p. palpalis* a ocuparem um espaço dimensional claramente distinto do grupo formado por *G. p. gambiensis*. Esta elevada diferenciação genética, detectada entre as populações de *G. p. gambiensis* da Guiné-Bissau e a população de *G.*

p. palpalis de Rio Campo (Guiné Equatorial), não é de todo inesperada uma vez que, além da distância geográfica existente entre estas regiões (ca. 2940 km), as populações pertencem a subespécies glossínicas diferentes e alopátricas.

A presença de alelos nulos teve pouco efeito nas estimativas obtidas para o parâmetro de diferenciação genética (F_{ST}) nas comparações entre amostras de *G. p. gambiensis*, embora tenha afectado a significância das mesmas. No entanto, nas comparações entre as subespécies, as estimativas de F_{ST} obtidas para a base de dados corrigida para alelos nulos foram consistentemente inferiores às obtidas para a base de dados original. Este resultado sugere que a presença de alelos nulos num número considerável de *loci* na população de *G. p. palpalis* poderá ter inflacionado as estimativas de F_{ST} , embora estas tenham permanecido elevadas em ambos os casos. A presença de alelos nulos não influenciou os resultados obtidos para as análises Bayesianas de subestruturação populacional e para a AFC, tendo-se mantido os dois *clusters* originalmente definidos, um contendo as amostras de *G. p. gambiensis* e outro contendo a amostra de *G. p. palpalis*.

Neste estudo, não foi evidente uma subdivisão entre populações insulares e continentais de *G. p. gambiensis* da Guiné-Bissau. A diferenciação medida por estimativas de F_{ST} entre a amostra de Bijagós (45 km afastada da costa) e as restantes não foi superior a algumas comparações entre amostras continentais ou envolvendo a ilha de Bolama, que é praticamente contígua ao continente. Do mesmo modo, a análise de *clusters* ou a AFC não demonstraram qualquer subdivisão entre ilhas e continente. Estes resultados contrastam com outros estudos comparando populações insulares e continentais de glossinas ou outros vectores, como é o caso de *G. p. gambiensis* da Guiné Conacri (Solano *et al.*, 2009) e *Anopheles gambiae* de São Tomé e Príncipe e Guiné Equatorial (Pinto *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2007). A reduzida diferenciação genética sugere a ocorrência de fluxo genético considerável entre as populações em estudo. Estas estimativas devem, contudo, ser interpretadas com algum cuidado na medida em que se deve ter em consideração a baixa capacidade de dispersão geralmente observada em espécies do Género *Glossina*. Uma população de glossinas que habite a savana consegue avançar no seu habitat cerca de 7 km por ano (Gooding & Krafur, 2005), embora, de um modo geral, a distância média de dispersão não ultrapasse os 10 km do local de nascimento, durante toda a vida (Hargrove, 2004). Assim, os dados de

dispersão conhecidos para *Glossina* sp. parecem não ser compatíveis com os níveis de fluxo genético entre ilhas e continente, embora a possibilidade de migração mediada pelo Homem não possa ser excluída (Lounibos, 2002). Os baixos níveis de diferenciação genética poderão também reflectir fenómenos históricos, tais como tempos de divergência relativamente recentes ou episódios de perturbação demográfica. Também não foi evidente uma particular diferenciação genética entre os diferentes habitats continentais, o que sugere que as transições floresta-savana ou urbano-rural não restringem o fluxo genético entre populações.

4.3. Expansão populacional

De um modo geral, todas as populações amostradas neste estudo apresentaram indícios de expansão populacional. Com excepção de Rio Campo (*G. p. palpalis*), os testes de heterozigotia revelaram um número significativo de *loci* em que $H_e < H_{eq}$ em todas as amostras e para ambos os modelos mutacionais ao nível da significância nominal. Os testes mantiveram-se significativos após correcção de Bonferroni para o modelo SMM em três das cinco amostras de *G. p. gambiensis* da Guiné-Bissau.

Tendo em conta que até à década de 60, do século passado, foram realizados trabalhos de controlo de tripanossomoses Africanas na Guiné-Bissau, que levaram à redução das glossinas existentes no país (Cruz Ferreira, 1947; Almeida, 1950; Azevedo, 1954), é de supor que as populações poderão ter sofrido uma redução no seu tamanho efectivo populacional durante esse período. As guerras civis e a instabilidade política verificada após a independência levaram à interrupção das actividades do programa de controlo incluindo a sua componente anti-vectorial. A interrupção das medidas de controlo de vectores poderá ter resultado numa subsequente expansão populacional de *G. p. gambiensis*.

Os sinais de expansão populacional detectados em *G. p. gambiensis* poderão também ter contribuído para o baixo nível de diferenciação genética observado entre estas populações. Em populações que experienciam uma expansão populacional, a crescente diversidade genética acumulada pela manutenção de novos alelos tende a homogeneizar a variância alélica entre populações e, consequentemente, diminuir o nível de diferenciação genética entre elas (Donnelly *et al.*, 2001). Este fenómeno de homogeneização pode ser ainda mais rápido para microssatélites, devido não só às

elevadas taxas de mutação mas também à própria natureza das mutações, que conferem maior probabilidade de gerar alelos já representados nas populações devido a casos de homoplasia e de restrições de tamanho (Estoup *et al.*, 2002).

4.4. Conclusões e implicações para o controlo

Apesar de significativa, as populações de *G. p. gambiensis* apresentaram uma baixa diferenciação genética, o que sugere uma reduzida subestruturação populacional, embora tenham sido analisadas amostras de populações insulares e continentais e de diferentes habitats (*i.e.* urbano, savana e floresta). Esta subestrutura pode não só reflectir a ocorrência de fluxo genético como estar associada a fenómenos de história demográfica. Por outro lado, foi detectada a evidência de que estas populações estão em expansão populacional, o que pode ter dissimulado o grau de isolamento genético entre populações. Assim, as restrições ao fluxo genético podem ser superiores às que depreendemos pelas estimativas de F_{ST} e análises Bayesianas, feitas com base em microssatélites.

Os resultados obtidos sugerem a presença de populações de *G. p. gambiensis* bem estabelecidas na Guiné-Bissau, com elevado polimorfismo. Estas observações, juntamente com o indício de uma expansão populacional recente, têm implicações ao nível da epidemiologia e controlo de tripanossomoses. Neste contexto, a aplicação de técnicas de controlo baseadas em insectos estéreis poderá não ser aconselhável no combate destas populações a curto-prazo. Estas técnicas, além de implicarem investimentos financeiros elevados, exigem que as populações-alvo sejam previamente reduzidas (Simarro *et al.*, 2008). Portanto, para o controlo vectorial e no imediato, é recomendável a adopção de medidas de controlo convencionais como o uso de armadilhas, a utilização de telas impregnadas com insecticidas e formulações insecticidas aplicadas no gado e outros animais domésticos (Gooding *et al.*, 2005; Camara *et al.*, 2006; Simarro *et al.*, 2008). Estas medidas deverão ser aplicadas simultaneamente em todo o país, de modo a evitar a reintrodução de glossinas em zonas de onde tenham sido eliminadas ou fortemente reduzidas. A integração de medidas de controlo genético deverá ser considerada numa segunda fase de implementação, uma vez confirmada a redução das populações glossínicas.

Além de indicativas de um elevado tamanho efectivo populacional, as evidências de expansão populacional e elevado polimorfismo sugerem ainda que estas populações poderão ter uma receptividade considerável ao restabelecimento da transmissão de tripanossomas na Guiné-Bissau. Tal é particularmente evidente quando não se encontram diferenças, nos níveis de diversidade genética, entre as populações de glossinas provenientes de regiões urbanas ou rurais. Este aspecto levanta a possibilidade de um contacto estreito entre populações humanas e glossínicas no país.

Posto isto, e considerando que a Guiné-Bissau é um país de “estatuto mal esclarecido”, no que diz respeito às tripanossomoses Africanas, é urgente a realização de novos estudos epidemiológicos na Guiné-Bissau, não só no que diz respeito à situação das tripanossomoses Africanas no país, mas também em relação às populações vectoras, à sua dinâmica populacional (*e.g. mark release recapture*) e às taxas de infecção tripanossómica.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

Abila, P.P., Slotman, M:A., Parmakelis, A., Dion, K.B., Robinson, A.S., Muwanika, V.B., Enyaru, J.C.K., Lokedi, L.M., Aksoy, S. and Caccone, A., 2008. High levels of genetic differentiation between Ugandan *Glossina fuscipes fuscipes* populations separated by Lake Kyoga. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [e-journal] 2 (5). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2386243/pdf/pntd.0000242.pdf> [acedido a 7 de Setembro de 2011].

Afonso, M.O. & Grácio, A.S., 2008. Mosca tsé-tsé, Nagana e Doença do sono: Factos Históricos, Contribuição Portuguesa para o Estudo e Combate e Factores de Recrudescência. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 15 (1/2), pp.1-16.

Afonso, M.O., 2000. *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850 (Diptera: Glossinidae) e *Trypanosoma brucei brucei* Plimmer e Bradford, 1899 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Utilização de um modelo experimental para estudo das inter-relações vector-parasita. Tese de doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Ahn, S.J., Costa, J. and Emanuel, J.R., 1996. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research*, 24 (13), pp.2623-25.

Allsopp, R. & Pillemon-Motsu, T.K., 2002. Tsetse control in Botswana - a reversal in strategy. *Pesticide Outlook*, 13 (2), pp.73-76.

Almeida, C.L., 1950. Relatório sobre os trabalhos de estudo das glossinas, efectuados até 1950. *Boletim Cultural da Guiné Portuguesa*, 5 (17), pp.53-60.

Almeida, P.A.R., 2007. *Diversidade genética e diferenciação das raças portuguesas de ovinos com base em marcadores de DNA-microsatélites: uma perspectiva de conservação*. Tese de doutoramento. Departamento de zootecnia. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Azevedo, J.F., 1954. A luta contra a doença do sono no Ultramar Português. *Jornal do Médico*, 4, pp.61-80.

Azevedo, J.F., 1964. Estado actual e perspectivas futuras do problema das tripanossomíases Africanas. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 21 (1/2), pp.5-22.

- Azevedo, J.F., Mourão, M.C. e Salazar, J.M.C., 1962. *Erradicação da Glossina palpalis palpalis da ilha do Príncipe* (1956 – 1958). Lisboa: Junta de Investigações do Ultramar.
- Badjana R., 2004. *Contribuição para o estudo de Glossina (Diptera, Glossinidae): aspectos da evolução da colónia de glossinas/UEM/IHMT, a distribuição glossínica e o conhecimento da população sobre a mosca de tsé-tsé, na Guiné-Bissau, em 2004*. Tese de mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
- Baker, M.D. & Krafur, E.S., 2001. Identification and properties of microsatellites markers in tsetse flies *Glossina morsitans sensu lato* (Diptera: Glossinidae). *Molecular Ecology Notes*, 1 (4), pp.234-36.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. and Bonhomme, F., 1996-2004. *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bettencourt, A. & Benoliel, 1907. Um grande perigo ameaça as nossas colónias. A doença do sono. *Ilustração Portuguesa*, 4, pp.180-84.
- Bouyer, J., Ravel, S., Dujardin, J.P., De Meeûs, T., Vial, L., Venon, S.T., Guerrini, L., Sidibé, I. and Solano, P., 2007. Population structure of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) according to landscape fragmentation in the Mouhoun river, Burkina Faso. *Journal of Medical Entomology*, 44 (5), pp.788-95.
- Bouyer, J., Ravel, S., Guerrini, L., Dujardin, J.P., Sidibé, I., Vreysen, M.J.B., Solano, P. and De Meeûs, T., 2010. Population structure of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) between river basins in Burkina Faso: Consequences for area-wide integrated pest management. *Infection, Genetics and Evolution*, 10 (2), pp.321-28.
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F. and Burri, C., 2010. Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, 375, pp.148-59.
- Buxton, P.A., 1955. *The natural history of tsetse flies*. London: H. K. Lewis & Co. Ltd.

- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C. and Sutherland, G.R., 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)n microsatellite markers. *The American Journal of Human Genetics*, 52 (5), pp.922-27.
- Camara, M., Caro-Riaño H., Ravel, S., Dujardin, J.P., Hervouet J.P., De Meeûs, T., Kagbadouno, M.S., Bouyer, J. and Solano, P., 2006. Genetic and morphometric evidence for population isolation of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) on the Loos Islands, Guinea. *Journal of Medical Entomology*, 43 (5), pp.853-60.
- Cankovic, M., Linden, M.D. and Zarbo, R.J., 2006. Use of microsatellite analysis in detection of tumor lineage as a cause of death in a liver transplant patient. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 130 (4), pp.529-32.
- Carlsson, J., 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity*, 99 (6), pp.616-23.
- Cecchi, G., Paone, M., Franco, J.R., Fèvre, E.M., Diarra, A., Ruiz, J.A., Mattioli, R.C. and Simarro, P.P., 2009. Towards the atlas of human African trypanosomiasis. *International Journal of Health Geographics*, [e-journal] 8 (15). Disponível em: <http://www.ij-healthgeographics.com/content/8/1/15> [acedido a 19 de Outubro de 2010].
- Chappuis, F., Lima, M.A., Flevaud, L. and Ritmeijer, K., 2010. Human African trypanosomiasis in areas without surveillance. *Emerging Infectious Diseases*, 16 (2), pp.354-56.
- Chapuis, M.P. & Estoup, A., 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (3), pp.621-31.
- Chinnock, P., 2009. Human African trypanosomiasis: an update. *TropIKA.net* [online]. Disponível em: <http://www.tropika.net/svc/review/Chinnock-20090320-Review-Tryps> [acedido a 28 de Janeiro de 2011].
- Chybicki, I.J. & Burczyk, J., 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity*, 100 (1), pp.106-13.

- CIA: The World Factbook – Guinea-Bissau, 2010. Central Intelligence Agency. [online] Disponível em: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/pu.html> [acedido a 15 de Abril de 2011].
- Corander, J. & Marttinen, P., 2006. Bayesian identification of admixture events using multi-*locus* molecular markers. *Molecular Ecology*, 15, pp.2833-43.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J. and Tang, J., 2008. Enhanced Bayesian modeling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, [e-journal] 9 (539). Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2105-9-539.pdf> [acedido a 7 de Setembro de 2011].
- Corander, J., Waldmann, P. and Sillanpää, M.J., 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163, pp.367-74.
- Cornuet, J.M. & Luikart, G., 1996. Description and power analysis of two detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144, pp.2001-14.
- Courtin, F., Jamonneau, V., Duvallet G., Garcia, A., Coulibaly, B., Doumenge, J.P., Cuny, G. and Solano P., 2008. Sleeping sickness in West Africa (1906–2006): changes in spatial repartition and lessons from the past. *Tropical Medicine and International Health*, 13 (3), pp.334-44.
- Cruz Ferreira, F.S., 1947. Acerca da doença do sono na Guiné Portuguesa. *Boletim Cultural da Guiné Portuguesa*, 2 (6), pp.363-74.
- Dawson, D.A., Burke, T., Hansson, B., Pandhal, J., Hale, M.C., Hinten, G.N. and Slate, J., 2006. A predicted microsatellite map of the passerine genome based on chicken–passerine sequence similarity. *Molecular Ecology*, 15 (5), pp.1299-320.
- De Meeûs, T., McCoy, K.D., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S. and Renaud, F., 2007. Population genetics and molecular epidemiology or how to “débusquer la bête”. *Infection, Genetics and Evolution*, 7, pp.308-32.

- Dempster, A.P., Laird, N.M. and Rubin, D.B., 1977. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society*, 39 (1), pp.1-38.
- Despommier, D.D., Gwadz, R.W., Hotez, P.J. and Knirsch, C.A., 2005. Parasitic Diseases. 5th Edition. [e-book] New York: Apple Trees Production, LLC. Disponível em. http://www.medicalecology.org/diseases/d_african_trypano.htm# [acedido a 17 de Março de 2011].
- Donnelly, M.J., Cuamba, N. and Lehmann, T., 2001. Evidence for recent population expansion in the evolutionary history of the malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. *Molecular Biology and Evolution*, 18, pp.1353-64.
- Dyer, N.A., Furtado, A., Cano, F., Ferreira, F., Afonso, M.O., Mabale N.N., Asumu, P.N., Lima, S.C., Benito, A., Weetman, D., Donnelly, M.J. and Pinto, J., 2009. Evidence for a discrete evolutionary lineage within Equatorial Guinea suggests that the tsetse fly *Glossina palpalis palpalis* exists as a species complex. *Molecular Ecology*, 18 (15), pp.3268-82.
- El Mousadik, A. & Petit R.J., 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic in Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, pp.832-39.
- Ellegren, H., 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, pp.435-45.
- Estoup, A., Jarne, P. and Cornuet, J.M., 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite *loci* and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11 (9), pp.1591-604.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, pp.564-67.

- Fèvre, E.M., Picozzi, K., Jannin, J., Welburn, S.C. and Maudlin, I., 2006. Human African trypanosomiasis: epidemiology and control. *Advances in Parasitology*, 61, pp.167-221.
- Fèvre, E.M., Wissmann, B.V., Wellburn, S.C. and Lutumba, P., 2008. The Burden of Human African Trypanosomiasis. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [e-journal] 2 (12). Disponível em: <http://www.plosntds.org/article/info:doi/10.1371/journal.pntd.0000333> [acedido a 13 de Fevereiro de 2011].
- Furtado, A.F.M., 2006a. *Estabelecimento e optimização de uma Técnica de amplificação e genotipagem de microsatélites para estudos populacionais de Glossina palpalis palpalis*. Mini-estágio de licenciatura. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- Furtado, A.F.M., 2006b. *Estudos de genética populacional de Glossina palpalis palpalis da Guiné Equatorial através da genotipagem de microsatélites*. Estágio final de licenciatura. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- Gillott, C., 2005. *Entomology*. 3rd Edition. Netherlands: Springer.
- Gooding, R.H. & Krafur, E.S., 2005. Tsetse Genetics: Contributions to Biology, Systematics, and Control of Tsetse Flies. *Annual Review of Entomology*, 50, pp.101-23.
- Gooding, R.H., Haines, L.R., Terry and Pearson, W., 2005. Tsetse Flies, the Glossinidae, and Transmission of African Trypanosomes. In Marquardt *et al.*, 2nd Edition (2005). *Biology of disease vectors*. London: Elsevier Academic Press. pp.153-64.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-Statistics. *The Journal of Heredity*, 86 (6), pp.485-86.
- Gouteux, J.P. & Lancien, J., 1986. Le piège pyramidal à tsetse (Diptera: Glossinidae) pour la capture et la lutte. Essais comparatifs et description de nouveaux systèmes de capture. *Tropical Medicine and Parasitology*, 37, pp.61-66.

- Grácio, A.J.S., 1999. Tsetse flies (Diptera: Glossinidae) and African Trypanosomiasis in Guinea-Bissau, West Africa. *Acta Parasitológica*, 2 (1/2), pp.51-56
- Guerrant, R.L., Walker, D.H. and Weller P.F., 2005. *Tropical infectious diseases – principles, pathogens & practice*. 2nd Edition. UK: Elsevier Health Sciences.
- Guo, S.W. & Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48, pp.361-72.
- Halverson, J.L. & Basten, C., 2005. Forensic DNA identification of animal-derived trace evidence: tools for linking victims and suspects. *Croatian medical journal*, 46 (4), pp.598-605.
- Hamilton, M.B., 2009. *Population genetics*. West Sussex, UK. Wiley-Blackwell.
- Hao, Z., Kasumba, I. and Aksoy, S., 2003. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33 (11), pp.1155-64
- Hargrove, J.W., 2003. *Tsetse eradication: sufficiency, necessity and desirability*. Edinburgh: DFID Animal Health Programme.
- Hargrove, J.W., 2004. Tsetse population dynamics. In Maudlin, I., Holmes, P.H. and Miles, M.A. (2004). *The Trypanosomiasis*. Wallingford, UK: CABI Publishing. pp.113-138.
- Hartl, D.L., 1988. A primer of population genetics. 2nd Edition. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Hartl, D.L., 2000. *A primer of population genetics*. 3rd Edition. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Holm, S., 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6 (2), pp.65-70.
- Hotez, P.J. & Kamath, A., 2009. Neglected Tropical Diseases in Sub-Saharan Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Disease Burden. *Plos Neglected Tropical*

Diseases, [e-journal] 3 (8). Disponível em: <http://www.plosntds.org/article/info:doi/10.1371/journal.pntd.0000412> [acedido a 19 de Fevereiro de 2011].

Jarne, P. & Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11 (10), pp.424-29.

Kamau, L., Mukabana, W.R., Hawley, W.A., Lehmann, T., Irungu, L.W., Orago, A.A.S. and Collins, F.H., 1999. Analysis of genetic variability in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* using microsatellite loci. *Insect Molecular Biology*, 8 (2), pp.287-97.

Karlsson, S. & Mork, J., 2005. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. *ICES Journal of Marine Science*, 62, pp.1588-96.

Kayondo, J.K., Mukwaya, L.G., Stump, A., Michel, A.P., Coulibaly, M.B., Besansky, N.J. and Collins, F.H., 2005. Genetic structure of *Anopheles gambiae* populations on islands in northwestern Lake Victoria, Uganda. *Malaria Journal*, [e-journal] 4 (59). Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/4/1/59> [acedido a 8 de Abril de 2011].

Kgori, P.M., Modo, S. and Torr, S.J., 2006. The use of aerial spraying to eliminate tsetse from the Okavango Delta of Botswana. *Acta Tropica*, 99 (2-3), pp.184-99.

Kim, S., Plagnol, V., Hu, T.T., Toomajian, C., Clark, R.M., Ossowski, S., Ecker, J.R., Weigel, D. and Nordborg, M., 2007. Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 39 (9), pp.1151-55.

Krafsur, E.S. & Endsley, M.A., 2002. Microsatellite diversities and gene flow in the tsetse fly, *Glossina morsitans s.l.* *Medical and Veterinary Entomology*, 16 (3), pp.292-300.

Krafsur, E.S., 2002. Population structure of the tsetse fly *Glossina pallidipes* estimated by allozyme, microsatellite and mitochondrial gene diversities. *Insect Molecular Biology*, 11 (1), pp.37-45.

- Krafsur, E.S., 2009. Tsetse flies: Genetics, evolution, and role as vectors. *Infection, Genetics and Evolution*, 9 (1), pp.124-41.
- Krafsur, E.S., Endsley, M.A., Wohlford, D.L., Griffiths, N.T. and Allsopp, R., 2001. Genetic differentiation of *Glossina morsitans centralis* populations. *Insect Molecular Biology*, 10 (4), 387-95.
- Krafsur, E.S., Marquez, J.G. and Ouma, J.O., 2008. Structure of some East African *Glossina fuscipes fuscipes* populations. *Medical and Veterinary Entomology*, 22, pp.222-27.
- Leak, S.G.A, 1999. *Tsetse biology and ecology – Their role in the epidemiology and control of trypanosomosis*. London: CABI Publishing.
- Lehmann, T., Hawley, W.A., Grebert, H., Danga, M., Atieli, F. and Collins, F.H., 1999. The Rift Valley complex as a barrier to gene flow for *Anopheles gambiae* in Kenya. *The Journal of Heredity*, 90 (6), pp.613-21.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A. and Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11 (12), pp.2453-65.
- Lounibos, L.P., 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 47, pp.233-66.
- Luikart, G. & Cornuet, J.M., 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12 (1), pp.228-37.
- Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J.M. and Sherwin, W.B., 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *The American Genetic Association*, 89, pp.238-47.
- Luna, C., Bonizzoni, M., Cheng, Q., Robinson, A.S., Aksoy, S. and Zheng, L., 2001. Microsatellite Polymorphism in Tsetse Flies (Diptera: Glossinidae). *Journal of Medical Entomology*, 38 (3), pp.376-81.

- Machado, A.B., 1958. Aspectos gerais da biologia do grupo *palpalis* existentes em territórios Portugueses. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 15 (3), pp. 59.
- Marquez, J.G., Vreysen, M.J.B., Robinson, A.S., Bado, S. and Krafur, E.S., 2004. Mitochondrial diversity analysis of *Glossina palpalis gambiensis* from Mali and Senegal. *Medical and Veterinary Entomology*, 18 (3), pp.288-95.
- Melachio, T.T.T, Simo, G., Ravel, S., De Meeûs, T., Causse, S., Solano, P., Lutumba, P., Asonganyi, T. and Njiokou, F., 2011. Population genetics of *Glossina palpalis palpalis* from central African sleeping sickness foci. *Parasites & Vectors*, [e-journal] 4 (140). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3162924/pdf/1756-3305-4-140.pdf> [acedido a 7 de Setembro de 2011].
- Moreno, M., Salgueiro, P., Vicente, J.L., Cano, J., Berzosa, P.J., de Lucio, A., Simard, F., Caccone, A., Do Rosário, V.E., Pinto, J. and Benito, A., 2007. Genetic population structure of *Anopheles gambiae* in Equatorial Guinea. *Malaria Journal*, [e-journal] 6 (137). Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-6-137.pdf> [acedido a 13 de Maio de 2011].
- Nei, M., 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York, USA: Columbia University Press.
- Oosterhout, C.V., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. and Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4 (3), pp.535-38.
- Park, S.D.E., 2001. *Trypanotolerance in West African cattle and population genetic effects of selection*. D. Phil Thesis. University of Dublin.
- Pinto, J., Donnelly, M.J., Sousa, C.A., Gil, V., Ferreira, C., Elissa, N., Do Rosário, V.E. and Charlwood, J.D., 2002. Genetic structure of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in São Tomé and Príncipe (West Africa): implications for malaria control. *Molecular Ecology*, 11 (10), pp.2183-87

- Piry, S., Luikart, G. and Cornuet, J.M., 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *The Journal of Heredity*, 90 (4), pp.502-03.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P., 2000a. Inference of population using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, pp.945-59.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A. and Donnelly, P., 2000b. Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, 67, pp.170–81.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E. and Hughes, C.R., 1993. Microsatellites and Kinship. *Trends in Ecology & Evolution*, 8 (8), pp.285-88.
- Ravel, S., De Meeûs, T., Dujardin, J.P., Zézé, D.G., Gooding, R.H., Dusfour, I., Sané, B., Cuny, G. and Solano, P., 2007. The tsetse fly *Glossina palpalis palpalis* is composed of several genetically differentiated small populations in the sleeping sickness focus of Bonon, Côte d'Ivoire. *Infection, Genetics and Evolution*, 7 (1), pp.116-25.
- Raymond, M. & Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, pp.248-49.
- Riehle, M.M, Guelbeogo, W.M, Gneme, A., Eiglmeier, K., Holm, I., Bischoff, E., Garnier, T., Snyder, G.M., Li, X., Markianos, K., Sagnon, N. and Vernick, K.D., 2010. A cryptic subgroup of *Anopheles gambiae* is highly susceptible to human malaria parasites. *Science*, 331, pp.596-98.
- Rizzi, K.R., 2010. A instabilidade contínua na Guiné-Bissau. *Meridiano*, 47 (117), pp.23-26.
- Roderick, G.K., 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41, pp.325-52.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, pp.103-06.

- Salgueiro, P.I.R., 2007. *Genetic structure and gene flow of fragmented bat populations – consequences for conservation*. Tese de doutoramento. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- Sauer, P., Müller, M. and Kang, J., 1998. Quantification of DNA. *Qiagen News*, 2, pp.23-26.
- Schlötterer, C. & Pemberton, J., 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. In DeSalle, R. and Schierwater, B. (1998). *Molecular approaches to ecology and evolution*. Berlin: Birkhäuser Verlag Basel. pp.71-86
- Simarro, P.P., Cecchi, G., Paone, M., Franco, J.R., Diarra, A., Ruiz, J.A., Fèvre, E.M., Courtin, F., Mattioli, R.C. and Jannin, J.G., 2010. The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *International Journal of Health Geographics*, [e-journal] 9 (57). Disponível em: <http://www.ij-healthgeographics.com/content/9/1/57> [acedido a 14 de Fevereiro de 2011].
- Simarro, P.P., Diarra, A., Postigo, J.A.R., Franco, J.R. and Jannin, J.G., 2011. The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [e-journal] 5 (2). Disponível em: <http://www.ploscollections.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0001007> [acedido a 10 de Março de 2011].
- Simarro, P.P., Jannin, J. and Cattand, P., 2008. Eliminating Human African Trypanosomiasis: Where do we stand and what comes next? *Plos Medicine*, 5 (2), pp.174-80.
- Solano, P., Duvallet, G., Dumas, V., Cuisance, D. and Cuny, G., 1997. Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica*, 65 (3), pp.175-80.

Solano, P., Kaba, D., Ravel, S., Dyer, N.A., Sall, B., Vreysen, M.J.B., Seck, M.T., Darbyshir, H., Gardes, L., Donnelly, M.J., De Meeûs, T. and Bouyer, J., 2010. Population genetics as a tool to select tsetse control strategies: suppression or eradication of *Glossina palpalis gambiensis* in the Niayes of Senegal. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [e-journal] 4 (5). Disponível em: <http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000692> [acedido a 27 de Janeiro de 2011].

Solano, P., La Rocque, S., Cuisance, D., Geoffroy, B., De Meeûs, T., Cuny, G. and Duvallet, G., 1999. Intraspecific variability in natural populations of *Glossina palpalis gambiensis* from West Africa, revealed by genetic and morphometric analyses. *Medical and Veterinary Entomology*, 13 (4), pp.401-07.

Solano, P., La Rocque, S., De Meeûs, T., Cuny, G., Duvallet, G. and Cuisance, D., 2000. Microsatellite DNA markers reveal genetic differentiation among populations of *Glossina palpalis gambiensis* collected in the agro-pastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. *Insect Molecular Biology*, 9 (4), pp.433-39.

Solano, P., Ravel, S., Bouyer, J., Camara, M., Kagbadouno, M.S., Dyer, N., Gardes, L., Herault, D., Donnelly, M.J. and De Meeûs, T., 2009. The Population Structure of *Glossina palpalis gambiensis* from Island and Continental Locations in Coastal Guinea. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [e-journal] 3 (3). Disponível em: <http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000392> [acedido a 27 de Julho de 2010].

Steverding, D., 2008. The history of African trypanosomiasis. *Parasites & Vectors*, [e-journal] 1 (3). Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/1/1/3> [acedido a 14 de Fevereiro de 2011].

Stich, A., Barret, M.P. and Krishna, S., 2003. Waking up to sleeping sickness. *Trends in Parasitology*, 19 (5), pp.195-97.

Tamarin, R.H., 2001. *Principles of genetics*. 7th Edition. New York, USA: The McGraw-Hill.

- Vreysen, M.J.B., Saleh, K.M., Lancelot, R. and Bouyer, J., 2011. Factory tsetse flies must behave like wild flies: a prerequisite for the Sterile Insect Technique. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [e-journal] 5 (2). Disponível em: <http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000907> [acedido a 10 de Março de 2011].
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 (6), pp.1358–70.
- Welburn, S.C., Fèvre, E.M., Coleman, P.G., Odiit, M. and Maudin, I., 2001. Sleeping sickness: a tale of two diseases. *Trends in Parasitology*, 17 (1), pp.19-24.
- White, B.J., Lawniczak, M.K.N., Cheng, C., Coulibaly, M.B., Wilson, M.D., Sagnon, N., Costantini, C., Simard, F., Christophides, G.K. and Besansky, N.J., 2011. Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to Plasmodium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (1), pp.244-49.
- World Health Organization, 2010. *First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical disease*. [pdf] Geneva: World Health Organization.
- Wright, S., 1931. Evolution and mendelian populations. *Genetics*, 16, pp.97-159.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da THA causada por <i>T. b. gambiense</i> e <i>T. b. rhodesiense</i> na África subsariana com a situação epidemiológica de cada país.	4
Figura 2. Gado bovino com nagana.	6
Figura 3. <i>Glossina</i> sp..	6
Figura 4. Antena e asa características de <i>Glossina</i> sp..	7
Figura 5. Distribuição dos diferentes Grupos de glossinas, com indicação do número de espécies e subespécies presentes em cada região para cada Grupo.	9
Figura 6. Ciclo de vida das glossinas.....	10
Figura 7. Genitália das glossinas do Grupo <i>palpalis</i> . À esquerda encontra-se a genitália do macho e à direita a genitália da fêmea	11
Figura 8. Exemplo de armadilhas utilizadas no controlo de glossinas..	17
Figura 9. Mapa da Guiné-Bissau. Regiões onde as glossinas deste estudo foram capturadas.	27
Figura 10. Dissecção de <i>Glossina palpalis gambiense</i> para extracção de DNA..	29
Figura 11. Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose (2%) corados com brometo de etídio..	44
Figura 12. Frequências estimadas de alelos nulos para cada <i>locus</i> e população..	48
Figura 13. Análise Bayesiana obtida pelo programa <i>BAPS</i>	50
Figura 14. Análise Bayesiana obtida pelo programa <i>Structure</i>	50
Figura 15. Análise Factorial de Correspondência com base nas diferenças alélicas entre os <i>loci</i> e populações em estudo.....	50
Figura 16. Análise Bayesiana obtida pelo programa <i>BAPS</i> com a base de dados corrigida para alelos nulos.	52
Figura 17. Análise Bayesiana obtida pelo programa <i>Structure</i> com a base de dados corrigida para alelos nulos.	52

Figura 18. Análise Factorial de Correspondência com base nas diferenças alélicas entre os *loci* e populações em estudo, obtida com a base de dados corrigida para alelos nulos. .. 53

Figura A. Frequências alélicas obtidas para os *loci* microssatélites.....ii

ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Características dos <i>loci</i> microssatélites em estudo.	31
Tabela 2. Composição das misturas de reacção para amplificação dos grupos de <i>loci</i> microssatélites formados através de PCR <i>multiplex</i>	32
Tabela 3. Condições de amplificação dos grupos de <i>loci</i> microssatélites formados para PCR <i>multiplex</i>	33
Tabela 4. Composição das misturas de reacção para amplificação dos <i>loci</i> microssatélites através de PCR simples.	33
Tabela 5. Condições de amplificação dos <i>loci</i> microssatélites formados para PCR simples.	34
Tabela 6. Pureza e concentração média do DNA extraído das amostras provenientes das diferentes regiões da Guiné-Bissau em estudo.	43
Tabela 7. Riqueza alélica, diversidade alélica, heterozigotia esperada e observada e estimativa do coeficiente de <i>inbreeding</i> para cada <i>locus</i> microssatélite e para cada população em estudo.	46
Tabela 8. Índices de fixação F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) obtidos entre pares de populações e para o total de <i>loci</i> microssatélite analisados.	49
Tabela 9. Índices de fixação F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) obtidos com a base de dados corrigida para alelos nulos entre pares de populações e para o total de <i>loci</i> microssatélite analisados.	51
Tabela 10. Probabilidades associadas aos défices ou excessos de heterozigotia (valor de P), para cada população em estudo, de acordo com os modelos TPM e SMM.	54
Tabela A. Distâncias geográficas aproximadas (km) entre as diferentes regiões da Guiné-Bissau, obtidas com auxílio do <i>software</i> Google™ Earth,	i
Quadro 1. Espécies e subespécies de glossinas de acordo com o Grupo ou Subgénero.	i

ANEXOS

Quadro 1. Espécies e subespécies de glossinas de acordo com o Grupo ou Subgénero.

Grupo <i>palpalis</i>	Grupo <i>morsitans</i>	Grupo <i>fusca</i>
<i>G. palpalis palpalis</i>	<i>G. morsitans morsitans</i>	<i>G. fusca fusca</i>
<i>G. p. gambiensis</i>	<i>G. m. submorsitans</i>	<i>G. f. congolensis</i>
<i>G. fuscipes fuscipes</i>	<i>G. m. centralis</i>	<i>G. nigrofusca nigrofusca</i>
<i>G. f. quanzensis</i>	<i>G. austeni</i>	<i>G. n. hopkinsi</i>
<i>G. f. martini</i>	<i>G. pallidipes</i>	<i>G. fuscipleuris</i>
<i>G. tachinoides</i>	<i>G. longipalpis</i>	<i>G. severini</i>
<i>G. pallicera pallicera</i>	<i>G. swynnertoni</i>	<i>G. vanhoofi</i>
<i>G. p. newsteadi</i>		<i>G. nashi</i>
<i>G. caliginea</i>		<i>G. tabaniformis</i>
		<i>G. longipennis</i>
		<i>G. brevipalpis</i>
		<i>G. medicorum</i>
		<i>G. schewtzi</i>
		<i>G. haningtoni</i>
		<i>G. frezili</i>

Quadro adaptado de Afonso (2000) e Leak (1999)

Tabela A. Distâncias geográficas aproximadas (km) entre as diferentes regiões da Guiné-Bissau, obtidas com auxílio do *software* Google™ Earth.

	Biombo	Bijagós	Bolama	Gabú
Bijagós	65,0			
Bolama	50,0	45,0		
Gabú	184,0	210,0	166,0	
Tombali	94,0	65,0	44,0	161,0

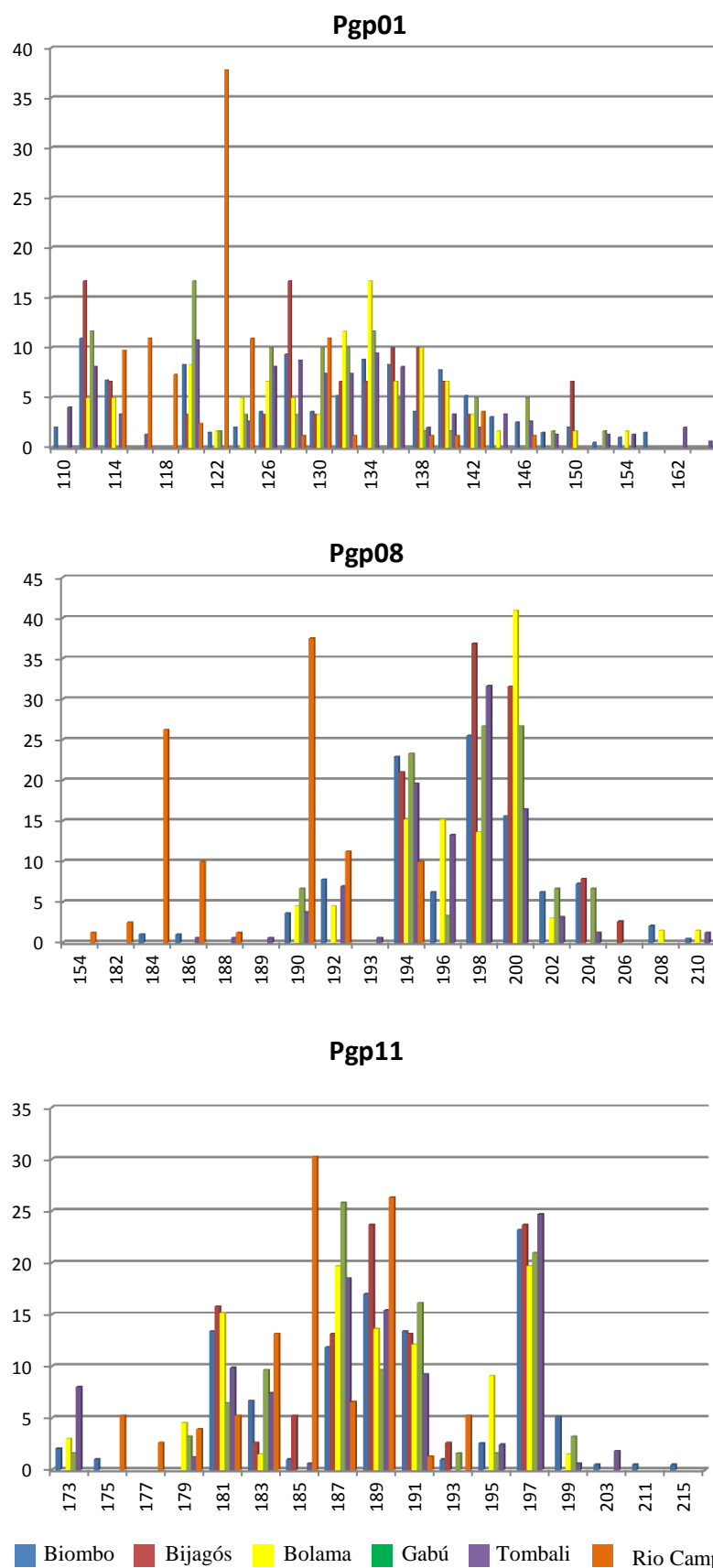


Figura A. Frequências alélicas obtidas para os *loci* microssatélites. Eixo dos xx: tamanho dos alelos em pares de bases; eixo do yy: frequências relativas de cada alelo em percentagem.

Figura A (continuação...)

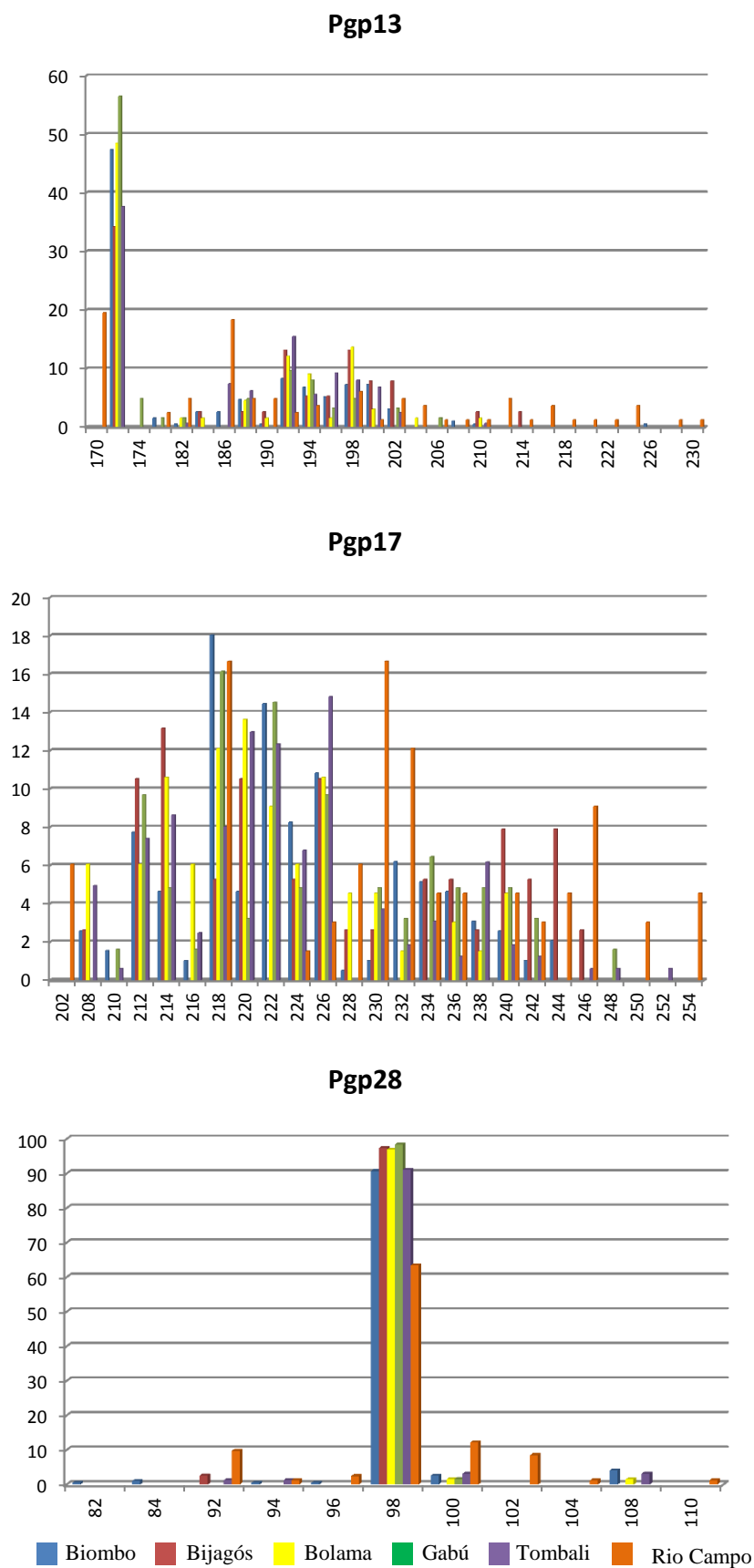


Figura A (continuação...)

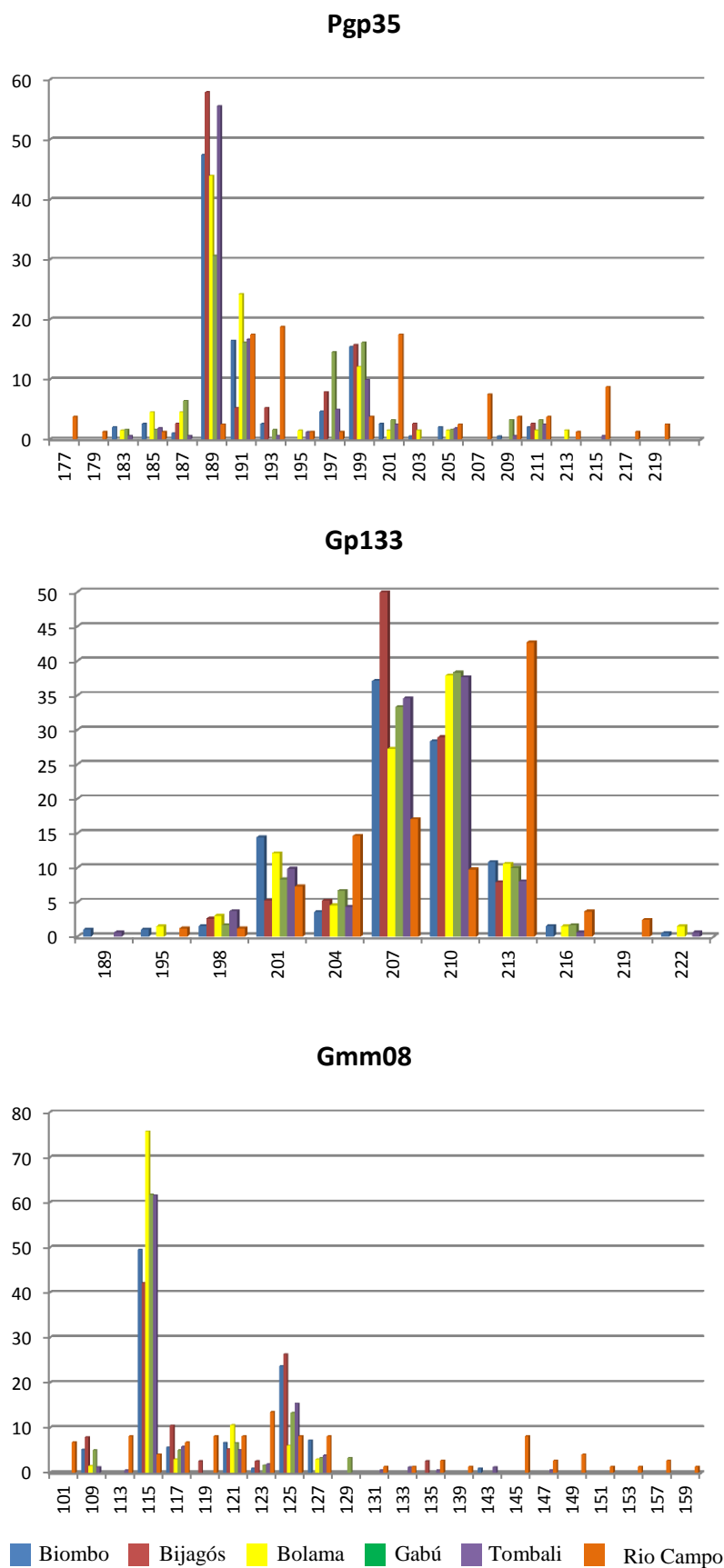


Figura A (conclusão.)

